



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

Caracterização das espécies de *Leishmania* em amostras biológicas de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana avaliados em sete unidades de saúde e estudo da fauna flebotomínica em áreas de três municípios do estado de Rondônia

CESARINO JUNIOR LIMA APRIGIO

Porto Velho – Rondônia

2013

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

CESARINO JUNIOR LIMA APRIGIO

Caracterização das espécies de *Leishmania* em amostras biológicas de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana avaliados em sete unidades de saúde e estudo da fauna flebotomínica em áreas de três municípios do estado de Rondônia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental da Universidade Federal de Rondônia – UNIR como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Experimental

Área de concentração: Parasita-Hospedeiro

Orientadora: Dra Izaltina Silva Jardim

Porto Velho – Rondônia

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

Aprígio, Cesarino Junior Lima

A654c

Caracterização das espécies de *Leishmania* em amostras biológicas de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana avaliados em sete unidades de saúde e estudo da fauna flebotomínica em áreas de três municípios do estado de Rondônia. / Cesarino Junior Lima Aprígio. Porto Velho, Rondônia, 2013.

140f.:il.

Tese (Doutorado em Biologia Experimental) – Núcleo de Saúde (NUSAU), Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2013.

Orientadora: Profa. Dra. Izaltina Silva Jardim.

1. Leishmaniose. 2. Leishmania. 3. PCR. 4. Flebotomíneos. I.
Título.

CDU: 616.993.161(811)

Bibliotecária Responsável: Eliane Gemaque / CRB11-549

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA

Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental (*PGBioExp*)

Candidato (a): CESARINO JUNIOR LIMA APRÍGIO

Titulo da Tese: Caracterização das espécies de *Leishmania* em amostras biológicas de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana avaliados em sete unidades de saúde e estudo da fauna flebotomínica em áreas de três municípios do estado de Rondônia.

Orientador (a): Profa. Dra. Izaltina Silva Jardim

A Comissão julgadora do trabalho de defesa da tese de doutorado, em sessão publica, realizada a 28 /06 /2013, considerou-o

☒ (X) Aprovado

☐ () Reprovado

Examinador(a): Dra Izaltina Silva Jardim

Instituição: IPEPATRO

Assinatura.....

Examinador(a): Dra. Márcia Pereira de Oliveira

Instituição: FIOCRUZ/RJ

Assinatura.....

Examinador(a): Dr. Eduardo Resende Honda

Instituição: CEPEN/LACEN

Assinatura.....

Examinador(a): Dr. Alexandre de Almeida e Silva

Instituição: IPEPATRO/PGBIOEXP

Assinatura.....

Examinador(a): Dr. Mauro Sugiro Tada

Instituição: CEPEN/IPEPATRO/PGBIOEXP

Assinatura.....

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, pelo Dom da vida, e por estar sempre me guiando e mostrando os melhores caminhos a seguir.

Á Dra. Izaltina Silva Jardim, professora, orientadora, por sua dedicação, empenho, ensinamentos durante o desenvolvimento do trabalho e, principalmente pela amizade e confiança.

Ao Dr Eduardo Honda, pela co-orientação e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

A Dra Márcia Oliveira do Laboratório Interdisciplinar em Pesquisas Médicas da FIOCRUZ/RJ pela co-orientação, contribuição para desenvolvimento e finalização deste trabalho.

Á Dra Elisa Cupollilo pela contribuição inestimável, auxílio e por abrir as portas do Laboratório em Pesquisas em Leishmanioses da FIOCRUZ/RJ para desenvolvimento deste trabalho.

À Dra Luiza e Rosimar integrantes do Laboratório Interdisciplinar em Pesquisas Médicas da FIOCRUZ/RJ por seu tempo e empenho.

Ao Marcos, Grazielle, Mariana e Bárbara do Laboratório em pesquisas em Leishmaniose por seu tempo e empenho.

Á Caroline Monte integrante do Laboratório de Quimioterapia do IPEPATRO pelos esforços em nos ajudar no desenvolvimento das atividades de coleta, cultivo e diagnóstico das amostras colhidas dos pacientes no CEPEN.

A Hilda, Isanilde, Dêlvania, Sharon, Janaina e Vanessa, colegas do laboratório que durante a convivência no laboratório de Quimioterapia que me ajudaram técnica e intelectualmente para o meu crescimento profissional.

A Joana Darc, Roger, Elton, Francisco e Ângela pela agradável convivência durante todo o experimento realizado no CEPEN.

Ao Dr Ricardo e a mestrande Lilian por nos auxiliar na complementação do diagnóstico molecular

A Alda Lobato, Roberto Maroso e Neia do LACEN/RO pela contribuição.

Ao Caio, Taína, Luiz Herman do IPEPATRO pela contribuição.

A Universidade Federal de Rondônia, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado em Biologia Experimental.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental da UNIR pelos ensinamentos.

A todos que ajudaram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

Dedico,

A minha esposa Margarete e meu filho Caio Henrique, pessoas importantes na minha vida, que me deram amor, incentivo, apoio e ajuda durante a minha caminhada.

Ofereço,

Ao meu Pai José Cesarino, minha mãe Maria Aldenisia, meus irmãos Tircianne, Plínio e sobrinhos Tirciano e Ana Sofia.

LISTA DE ABREVIACÕES

ELISA – *Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay*

IFI - Imunofluorescência indireta

ITS - Espaçador interno transcrito (do inglês *Internal transcribed spacers*)

HSP - Proteínas do choque térmico (do inglês *Heat Shock Proteins*)

kDNA - DNA do cinetoplasto

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LC - Leishmaniose Cutânea

LCD - Leishmaniose Cutânea Difusa

MLEE - Electroforese enzimática de multilocus, (do inglês *Multilocus enzyme electrophoresis*)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Tampão salino fosfato, (do inglês *Phosphate-buffered saline*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase chain reaction*)

RFLP – Hidrólise do DNA amplificado por endonucleases de restrição, (do inglês *Restriction fragment lenght polymorphism*)

WHO – Organização Mundial de Saúde, (do inglês *World Health Organization*)

LPG – Lipofosfoglicano

LIT – Infusão de fígado e triptose (do inglês *Liver Infusion Triptose*)

RPMI - Instituto Roswell Park Memorial

LACEN – Laboratório Central em Saúde Pública

CEPEM – Centro de Pesquisas em Medicina Tropical

LAFRON – Laboratório de Fronteiras

NNN - Novy MacNeal Nicolle

PVH1 – Localidade 1 de coleta de flebótomos no município de Porto Velho

PVH 2 - Localidade 2 de coleta de flebótomos no município de Porto Velho

GM1 - Localidade 1 de coleta de flebótomos no município de Guajará Mirim

GM2 - Localidade 2 de coleta de flebótomos no município de Guajará Mirim

GM3 - Localidade 3 de coleta de flebótomos no município de Guajará Mirim

CJ1 – Localidade de coleta de flebótomos no município de Candeias do Jamari

LISTA DE QUADROS

Pag

QUADRO 1. Classificação Taxonômica dos complexos de <i>Leishmania</i> em seus subgêneros	21
QUADRO 2. Espécies de flebotomíneos incriminados como vetores da LTA no Brasil e seus respectivos habitats	27
QUADRO 3. <i>Primers</i> utilizados para a detecção de leishmanias em amostras de pacientes com LTA avaliados em sete unidades de saúde do estado de Rondônia	51

LISTA DE TABELAS

Pag

TABELA 1. Quantitativo de amostras por municípios submetidos as técnicas de diagnósticos realizadas durante o desenvolvimento do experimento	46
TABELA 2. Distribuição de casos segundo sexo e faixa etária	60
TABELA 3. Distribuição de casos de LTA segundo escolaridade e ocupação dos pacientes	61
TABELA 4. Exames realizados nas amostras de pacientes encaminhados ao LACEN, LAFRON e CEPEM, no período de Maio/2010 a Agosto/2012, Rondônia, Brasil	63
TABELA 5. Comparação dos resultados do parasitológico direto, PCR-kDNA, cultura e inoculação em camundongo segundo município de residência das amostras encaminhadas ao LACEN, LAFRON e CEPEM no período de Maio/2010 a Agosto/2012	64
TABELA 6. Resultados das PCRs utilizando <i>primers</i> para kDNA, ITS-1 e HSP70p4, segundo quantidade de amastigotas visualizadas nas lâminas do parasitológico direto de pacientes encaminhados ao LACEN, LAFRON e CEPEM de Maio/2010 a Agosto/2012, Rondônia, Brasil	66
TABELA 7. Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> identificadas por RFLP da PCR-ITS-1 e/ou sequenciamento do material obtido por PCR-ITS-1 e PCR-HSP70p4, segundo município de residência de pacientes encaminhados ao LACEN, LAFRON e CEPEM, no período de Maio de 2010 a Agosto de 2012, Rondônia, Brasil.	69
TABELA 8. Espécies de flebotomíneos coletados nas duas localidades do município de Porto Velho, Rondônia, Brasil, no período de janeiro a setembro de 2011	71

TABELA 9. Total de espécies de flebotomíneos coletados nas três localidades do município de Guajará Mirim, Rondônia, Brasil, no período de agosto de 2010 a dezembro de 2011 74

TABELA 10. Espécies de flebotomíneos coletados no município de Candeias do Jamari, Rondônia, Brasil, no período de novembro de 2010 a maio de 2011 76

LISTA DE FIGURA	Pag
FIGURA 1. Estátua descoberta no Equador (época pré-Colombiana): lesões múltiplas do nariz	19
FIGURA 2. Classificação Taxonômica da <i>Leishmania</i>	20
FIGURA 3. Representação esquemática da estrutura das fases evolutivas da <i>Leishmania</i>	22
FIGURA 4. Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp	24
FIGURA 5. Fotos dos estágios dos flebotomíneos	26
FIGURA 6. Ciclo de Transmissão da <i>Leishmania Leishmania amazonensis</i> na região Amazônica do Brasil	29
FIGURA 7. Ciclo de Transmissão da <i>Leishmania Viannia braziliensis</i>	29
FIGURA 8. Ciclo de transmissão da <i>Leishmania guyanensis</i> na Amazônia	30
FIGURA 9. Classificação clínica da Leishmaniose Tegumentar Americana	32
FIGURA 10. Tipos de Lesões cutânea da LTA	34
FIGURA 11. Tipos de lesões mucosas da LTA	36
FIGURA 12. Fluxograma das etapas de coleta de material biológico, estudo da fauna flebotomínica e técnicas laboratoriais para a identificação das espécies de <i>Leishmania</i>	44
FIGURA 13. Áreas de coletas de flebotomíneos no município de Porto Velho, (PVH1 e PVH2) Rondônia, Brasil, 2011	53
FIGURA 14. Áreas de coletas de flebotomíneos no município de Guajará Mirim (GM1, GM2 e GM3), Rondônia, Brasil, 2011	55
FIGURA 15. Área de flebotomíneos no município de Candeias do Jamari, Rondônia, Brasil, 2011	56

FIGURA 16. Distribuição das amostras de pacientes de LTA avaliadas no Estado de Rondônia, segundo município de residência.	58
FIGURA 17. Distribuição das amostras de pacientes de LTA dos pontos de coleta (CEPEM, LACEN/RO e LAFRON), segundo município de residência avaliado no período de maio de 2010 a agosto de 2012.	59
FIGURA 18. Distribuição das lesões nos pacientes estudados no período maio de 2010 a agosto de 2012	62
FIGURA 19. Localização das lesões segundo o sexo dos pacientes estudados no período maio de 2010 a agosto de 2012	62
FIGURA 20. Gel de eletroforese representativo demonstrando a amplificação dos sistemas de PCRs	65
FIGURA 21. Distribuição das espécies identificadas por RFLP da PCR-ITS-1 e/ou sequenciamento do material obtido por PCR-ITS-1 e PCR-HSP70p4, segundo município de residência dos pacientes estudados no período maio de 2010 a agosto de 2012	68
FIGURA 22. Distribuição dos potenciais vetores da LTA nos município de Porto Velho, no período de janeiro a setembro de 2011	70
FIGURA 23. Distribuição dos potenciais vetores da LTA no município Guajará Mirim coletados no período de agosto de 2010 a dezembro de 2011	72
FIGURA 24. Caracterização da fauna flebotomínica nas localidades (GM1, GM2, GM3) do município de Guajará Mirim, Rondônia	73
FIGURA 25. Distribuição dos potenciais vetores da LTA no município de Candeias do Jamari coletados no período de novembro de 2010 a maio de 2011	75

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), no Estado, é a segunda enfermidade causada por protozoário com maior número de casos notificados, atrás apenas de Malária. Rondônia é o terceiro estado da região norte e a oitava Unidade Federativa do país com maior número de casos de LTA, tendo apresentado no período de 2000 a 2010 uma média de 1427 casos anuais, distribuídos nos 52 municípios. Tem-se a hipótese que a doença, no estado, seja causada pelas espécies *L. (V) braziliensis*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V) naiffi*, *L. (V) lainsoni* ou *L. (L) amazonensis*. Os estudos realizados no Estado identificaram mais de 100 flebotomos, dentre os quais se observou a presença de vetores potenciais para transmitir outras espécies de *Leishmania*. Contudo, a distribuição das leishmanias e dos vetores responsáveis pela transmissão deste agente é pouco conhecida. Portanto, objetivo do trabalho foi identificar e caracterizar as espécies de *Leishmania* causadores de LTA e seus potenciais transmissores no estado de Rondônia. Para isto, foram selecionadas lâminas coradas com material de lesões de pacientes com LTA, oriundas de sete unidades de saúde. Além disso, no município de Porto Velho, foram realizadas coletas de amostras nas lesões (escarificado e punção intersticial) de pacientes com suspeita clínica da doença, para posterior realização do exame parasitológico direto em lâmina (PDL), inoculação em camundongos Balb/c e em meio de cultura bifásico para isolamento e produção de biomassa. Extraíu-se o DNA de todas as amostras positivas no PDL, cultura e inoculação em camundongo. Posteriormente, o produto extraído foi submetido à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando iniciadores para os alvos kDNA, ITS-1 e HSP70-p4. Em seguida, foi realizada a identificação das espécies através da PCR-RLFP e sequenciamento genômico. As capturas de flebotomíneos foram realizadas nos municípios de Porto Velho, Candeias do Jamari e Guajará-Mirim. Armadilhas tipo CDC foram colocadas no período de 18:00 às 06:00 horas. Os flebotomos coletados foram mortos, separados e acondicionados em tubos com álcool a 70% até a realização da identificação por meio da chave taxonômica de Young & Duncan (1994). Das 240 amostras avaliadas no estudo, 86,96% pertenciam a pacientes do sexo masculino. A forma clínica predominante foi cutânea (98,26%), tendo maior distribuição nos membros inferiores. No diagnóstico laboratorial 75% das amostras foram positivas em pelo menos uma das PCRs, sendo a PCR-kDNA que obteve os melhores resultados (66,26%). Adicionalmente, das 95 amostras positivas nas PCR-ITS-1 e HSP70-p4, conseguiu-se a identificação da espécie em 73,7% das amostras, com caracterização de cinco espécies diferentes: *L. (V) braziensis* (46,37%), *L. (L) amazonensis* (10,15%), *L. (V) guyanensis* (8,69%), *L. (V) naiffi* (1,45%), *L. (V) lainsoni* (1,45%) e 33,34% amostras apresentaram perfis indiferenciáveis entre *L. (V) braziensis* e *L. (V) guyanensis*. Na coleta de flebotomos, foram identificados 1863 espécimes. A espécie *Lu. antunesi* predominou em todo estudo, sendo encontrada em quatro das seis áreas avaliadas. Observou-se, em todas as localidades de coleta do estudo, a presença de no mínimo seis espécies vetoras incriminadas na transmissão das leishmanias. Conseguiu-se demonstrar, no estudo, que a PCR-kDNA é o melhor sistema para detecção da *Leishmania* em material de lâmina corada, contudo com sensibilidade inferior a observada ao parasitológico direto. E, que a maioria das áreas estudadas, nos três municípios, demonstrou risco de transmissão da LTA, devido a presença de espécies vetoras na fauna flebotomínica de importância médica associada a casos humanos de LTA.

Palavras chave: Leishmaniose, *Leishmania*, PCR, flebotomíneos.

ABSTRACT

The american cutaneous leishmaniasis is the second disease caused by protozoan parasites currently in the state of Rondonia in number of reported cases, behind only of Malaria. Nationally, Rondônia is the third state in the northern region and the eighth of Federal Unit of the country with the highest number of cases of ACL, with annual average of 1427 cases, between 2000 - 2010, distributed in 52 municipalities. Believed that the Leishmaniasis in the state of Rondônia is caused by the species *L.(V) braziliensis*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V) naiffi*, *L. (V) lainsoni* and *L. (L) amazonensis*. Studies performed in the state identified more than 100 sand flies, among which potential vectors, which can carry forward other Leishmania species. Nevertheless, the distribution of Leishmania and the vectors responsible for the transmission of this agent is little known. Therefore, the objective this study was to identify and characterize the species of Leishmania causing LTA and potential vectors in the state of Rondônia. For this, were selected stained slides with material of LTA patients injury, from seven health units. In the city of Porto Velho, samples were collected from the lesions (scarified and interstitial puncture) of patients with clinical suspicion of the disease for subsequent realization of direct parasitological examinations of slides, inoculation in mice Balb/c and in biphasic culture medium for isolation and producing biomass of Leishmanias. The DNA was extracted from all samples positive to the direct parasitological examination, culture and inoculation into mice. Subsequently, the extracted product was submitted to Polymerase Chain Reaction (PCR) using primers for the target kDNA, ITS-1 and HSP70-p4. Then, it was made the specie identification by PCR-RFLPs and genomic sequencing. The capture of sand flies was in the cities of Porto Velho, Candeias do Jamari and Guajará-Mirim. CDC traps were placed in the period from 18:00 to 06:00 hours. The sand flies were collected, dead, separated in tubes with 70% alcohol until the realization of the identification by taxonomic key of Young & Duncan (1994). The study tested 240 samples, which 86.96% were from male patients. The predominant clinical form was cutaneous leishmaniasis (98.26%), with wider distribution in the lower limbs. In the laboratory diagnosis, 75% of samples were positive in at least one of PCRs, and the PCR-kDNA that obtained the best results (66.26%). In addition, it was possible to identify the species in 73,7% of the 95 PCR-ITS-1 and HPSP70-p4 positive samples, with characterization of five different species: *L. (V) braziensis* (46.37%), *L. (L) amazonensis* (10.15%), *L. (V) guyanensis* (8.69%), *L. (V) naiffi* (1.45%), *L. (V) lainsoni* (1.45%) and 33.34% samples had profiles indistinguishable to *L. (V). braziensis* and *L. (V) guyanensis*. In the collect of sandflies were identified 1863 specimens. The specie *L. Antunesi* was prevailed throughout the study, which was found in four of the six areas assessed. It was observed in all localities of the study, the presence of at least six vector species incriminated in the transmission of leishmaniasis. It was demonstrated in this study that the PCR-kDNA is the best system for detection of *Leishmania* in material of stained slide, but with lower sensitivity than that observed in the direct parasitological examination. And most of the areas studied in the three counties, showed a risk for transmission of ACL due to the presence of sand flies of medical importance associated with and human cases of ACL.

Keywords: Leishmaniose, Leishmania, PCR, sandflies

SUMÁRIO

	Pag
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Aspectos históricos da Leishmaniose Tegumentar Americana	18
2.2. Agente Etiológico	20
2.3. Flebotomíneos como vetores das leishmanioses	25
2.4. Ciclo de transmissão das leishmanias	28
2.5. Características clínicas da LTA	31
2.6. Diagnóstico laboratorial	36
3. OBJETIVOS	43
3.1. Objetivo Geral	43
3.2. Objetivos específicos	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1. Desenho do estudo	44
4.2. Coleta de amostras das lesões dos pacientes	44
4.3. Testes de diagnóstico	46
4.4. Extração e quantificação do DNA gênomico	49
4.5. Cepas de referência e controle	49
4.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	50
4.7. Testes de identificação das espécies de <i>Leishmania</i> (PCR-RFLP e sequenciamento gênomico)	51
4.8. Locais de coleta do inseto vetor	52
4.9. Coleta de Vetores	56
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
6. RESULTADOS	58
6.1. Caracterização da população do estudo	58
6.2. Testes de diagnóstico	63

6.3. Avaliação das amostras extraídas das lâminas submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR)	64
6.4. Comparação da Sensibilidade da PCR comparada com os outros métodos de diagnósticos	66
6.5. Identificação das espécies de <i>Leishmania</i>	67
6.6. Identificação das espécies de flebotomíneos	70
7. DISCUSSÃO	77
7.1. Perfil epidemiológico e clínico da população com LTA no estudo	77
7.2. Métodos de diagnósticos	82
7.3. Fauna flebotomínica identificada no estudo	93
8. CONCLUSÃO	99
9. REFERÊNCIAS	100
10. ANEXOS	121
10.1. ANEXO 1. Parecer do comitê de ética em pesquisa humana	122
10.2. ANEXO 2. Termo de consentimento livre e esclarecimento	123
10.3. ANEXO 3. Ficha cadastral de pacientes para diagnóstico da LTA	124
10.4. ANEXO 4. Parecer da comissão de ética em uso de animais	125
10.5. ANEXO 5. Artigo submetido	126

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antroponoses consideradas como um conjunto de doenças, que apresentam caráter infeccioso, não contagioso causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Este parasito apresenta um ciclo de vida heteroxênico, vivendo alternadamente em artrópodes vetores e hospedeiros vertebrados, inclusive no homem (REY, 2001; NEVES, 2005). Os humanos são infectados de maneira acidental quando adentram no ecossistema florestal primitivo, onde ocorre o ciclo da doença entre reservatórios mamíferos e insetos vetores. A infecção humana resulta em uma doença clínica que pode ser uma simples lesão cutânea, lesões múltiplas, apresentar acometimento das mucosas ou vísceras (DESJEUX, 1998). Quando a infecção acomete a pele ou mucosas é denominada de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e quando infecta as vísceras é chamada de Leishmaniose Visceral (BRASIL, 2007a).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 12 milhões de pessoas estão infectados e estima-se que ocorram mais de um milhão de casos novos de leishmanioses a cada ano. A maioria dos casos ocorre no Afeganistão, Arábia Saudita, Bangladesh, Bolívia, Brasil, Índia, Irã, Nepal, Peru, Síria e Sudão (LINDOSO; LINDOSO, 2009). As leishmanioses são endêmicas em 88 países, distribuídas entre as regiões tropicais e subtropicais dos continentes americano, africano, europeu e asiático. São enfermidades consideradas como um problema de saúde pública em países em desenvolvimento, dentre os quais apenas 32 têm a doença com caráter de notificação obrigatória (OMS, 2012).

Nas Américas, a infecção típica da LTA encontra-se distribuída desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, tendo como espécie vetora de transmissão dípteros pertencentes à subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* (KILLICK-KENDRICK, 1999; RANGEL; LAINSON, 2003; REITHIGER et al., 2007). Nesta região habitam mais de 400 espécies de flebotomíneos e destas, 40 estão envolvidas na transmissão de espécies de *Leishmania* (GALATI, 2003; ANDRADE; DANTAS-TORRES, 2010). No Brasil, foram identificadas 217 espécies de flebotomos, sendo que 122 já foram observadas na região amazônica e destas 25 apresentam comportamento antropofílico (CIPA, 1999; GIL et al., 2009).

Atualmente, na América Latina, são reconhecidas 14 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doenças em humanos e oito espécies descritas somente em animais (BRASIL, 2007a), sendo que destas sete [*Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *L.* (*Viannia*)

guyanensis, *L. (Viannia.) naiffii*, *L. (Viannia.) lainsoni*, *L. (Viannia.) shawi*, *Leishmania (V) lindebergi* e *L. (Leishmania.) amazonensis*] já foram identificadas infectando os homens no Brasil. A *L. (V.) braziliensis* causa úlceras cutâneas, mas, às vezes, é responsável por formas mucocutâneas, denominada espúndia. A *L. (V.) guyanensis* pode causar metástases ao longo dos trajetos linfáticos e é conhecida como *pian-bois*. A infecção por *L. (L.) amazonensis*, ocasionalmente, resulta em lesões cutâneo-difusas (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

No Brasil, a LTA se apresenta como doença emergente e reemergente em franca expansão, é um agravo de notificação compulsória e que está distribuída em todas as 27 unidades federativas (BRASIL, 2012). Tanto que entre 2000 e 2010 foram registrados 282.554 casos da doença, sendo que no último ano foram verificados os maiores coeficientes de detecção nas regiões Norte (44,5/100.000) e Centro-Oeste (22,5/100.000), especialmente nos estados de Roraima, Acre, Mato Grosso, Amapá, Rondônia, e Tocantins (BRASIL, 2012). O perfil epidemiológico da LTA era predominantemente de uma enfermidade de ambiente silvestre. Contudo, a ecoepidemiologia desta enfermidade vem se alterando, apresentando focos endêmicos em localidades que não apresentam ambiente silvestre clássico, como em regiões periurbanas de grandes cidades ou áreas onde as florestas naturais praticamente desapareceram (TOLEZANO, 1994; RAMOS; DE MOURA CASTRO, 2002; BACHA, 2009).

A LTA no estado de Rondônia é a segunda doença causada por protozoário que mais apresenta casos notificados, perdendo apenas para Malária. O Estado é a oitava Unidade Federativa do país e o terceiro da Região Norte em notificação de casos, apresentando uma média de 1427 casos nos anos 2000 a 2010, com distribuição em todos os municípios do Estado (BRASIL, 2012). Adicionalmente, há suposições que os casos de LTA no estado sejam causados por *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffii* e *L. (V.) lainsoni* (BRASIL, 2007a). Estudos da fauna flebotomínica realizados no Estado identificaram mais de 100 flebótomos e detectou a presença de pelo menos 25 insetos vetores capazes de carrear outras espécies de *Leishmania* que poderiam infectar o ser humano (GIL et al, 2003; GIL et al, 2009; TELES et al, 2013).

Em Rondônia a doença acomete, em sua maioria, indivíduos que desempenham atividades ligadas à agricultura, pecuária, extrativismo vegetal, extrativismo mineral ou ecoturismo. Nos últimos anos o Estado foi inserido no projeto de construção de duas hidrelétricas (Jirau e Santo Antônio), que induziu a uma transformação ecológica e econômico-social, principalmente nas regiões onde foram instaladas estas usinas. A

estimativa do impacto da construção destas usinas no Estado, apesar de estudos realizados, são imprecisos, uma vez que a realização de um projeto desta magnitude as consequências não vão se restringir nas áreas construídas (MAGALHÃES, 2006; CUNHA, 2008). Com a destruição da floresta primária, insetos com a capacidade de transmitir doenças e constatada adaptabilidade ambiental, *e.g.* dos flebotomíneos, poderiam migrar para áreas de ambiente antrópico próximo a estas construções causando doenças. Aliado a isto, à migração de pessoas de outros estados e até mesmo de outros países, também poderia carrear agentes infecciosos causadores de enfermidades que não existem no estado, como é o caso da Leishmaniose Visceral, agravando ainda mais as condições de vigilância e atenção básica na saúde pública do estado.

Portanto, o conhecimento da situação da distribuição de doenças, assim como seus transmissores e agentes etiológicos, principalmente, em enfermidades transmitidas por insetos, é muito importante para elaboração de ações de vigilância epidemiológica, controle e tratamento destas enfermidades.

A Leishmaniose Tegumentar Americana, deve ter uma atenção especial em vista que pouco se tem conhecimento da distribuição das leishmanias, assim como também quais seriam as espécies responsáveis em causar a enfermidade em humanos. Também não se sabe quais flebotomíneos são responsáveis em transmitir a doença em humanos. Outro fator importante, os testes de diagnóstico da LTA da rede pública de saúde, restringem-se a identificação do parasita na lesão do paciente, sem que haja interesse em descobrir o agente causador e o vetor transmissor desta enfermidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos históricos da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

As leishmanioses são zoonoses que se encontram entre as doenças infecto parasitárias de maior importância no mundo. Clinicamente possuem um caráter multifacetado, acometendo várias espécies de animais silvestres, domésticos e inclusive o homem. Segundo a OMS, mais de 12 milhões de pessoas encontram-se acometidos com leishmaniose e cerca de 350 milhões de pessoas estão sob o risco de adoecer (GARCIA et al, 2005; OMS, 2012). Nas Américas, África, Ásia e Europa estimam-se que haja, anualmente, uma incidência em torno de 1,5 milhões de casos novos de Leishmaniose Tegumentar Americana e 500 mil casos de Leishmaniose Visceral (Calazar) (OMS, 2012). O agente etiológico destas antropozoonoses são protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, parasitas digenéticos transmitidos aos hospedeiros mamíferos através da picada das fêmeas hematófagas de dípteros pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (RANGEL; LAINSON, 2003).

A LTA já vem sido descrita desde o primeiro século da era cristã em relatos de feridas de pele em países como Iraque, Síria e Afeganistão nos quais recebiam nomes de acordo com a região que era identificada (BASANO; CAMARGO, 2004; NEVES, 2005). Na América Latina, existem algumas hipóteses sobre a origem das leishmanioses, dentre as quais uma mencionava que a LTA tinha origem mediterrânea, sendo introduzida no nordeste brasileiro, ainda na antiguidade, pelos fenícios ou sírios. Estes autores baseavam suas afirmações na similaridade das lesões de pacientes com LTA na Bahia com as lesões dos indivíduos observadas naquela região (PUPO, 1926; ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003). A hipótese mais aceita afirma que a enfermidade tem autoctonia na América Latina, presente desde a chegada do ser humano há 30 mil anos atrás, como comprovado em mumificações indígenas com mais de dois mil anos (CAMARGO, 2008; BACHA, 2009). Além disso, historiadores encontraram cerâmicas de índios andinos pré-colombianos com imagens, formas de rostos esculpidos ou até mesmo estátuas mutiladas, datados de 400 a 900 d.C, que lembram lesões características de formas cutâneas e mucocutâneas da LTA (BRÜCKER; GENTILINI, 1987; BASANO; CAMARGO, 2004) (**FIGURA 1**). Em meados do século XVI, cronistas espanhóis descreveram índios andinos amazônicos com a doença dos narizes que tinham a característica de “comer” a carne dos narizes, lábios e mucosas (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003).

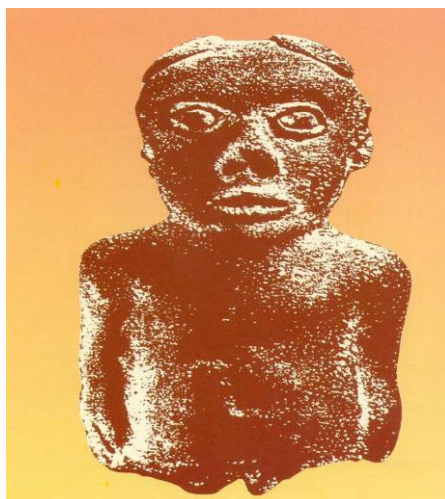


FIGURA 1. Estátua descoberta no Equador, época pré-Colombiana: lesões múltiplas do nariz. (retirado de SILVA, 2003)

No Brasil, a referência mais antiga da LTA ocorreu em 1827 com o documento da Pastoral Religioso-Político Geographico, intitulado “Antiguidad de la Syphilis en el Peru”, no qual relata a viagem do Missionário Frei Dom Hipolito Sanches de Fayas y Quiros pela região amazônica. Neste trabalho são descritos habitantes nativos apresentando lesões nos braços e pernas, que surgiram em decorrência das picadas de insetos, e que alguns dos indivíduos acometidos desenvolviam lesões destrutivas na boca e nariz (PARAGUASSU-CHAVES, 2001; VALE; FURTADO, 2005). Apesar disso, a observação do agente etiológico ocorreu somente em 1909, com Lindenberg demonstrando a presença dos “corpúsculos de Leishman-Donovan” (formas amastigotas da *Leishmania*) em lesões da pele e da cavidade nasal e oral de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do Estado de São Paulo. As características destes parasitos assemelhavam-se aos observados na leishmaniose do velho mundo causada por *Leishmania tropica* (PESSÔA, 1982; GUIMARÃES, 2011). Em 1911, Gaspar Vianna propôs nominar o agente etiológico da LTA no Brasil de *Leishmania braziliensis* por considerar este parasito diferente da *Leishmania tropica* (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BASANO; CAMARGO, 2004). A partir de 1960, descobertas importantes aconteceram acerca da ecoepidemiologia das leishmanioses. O protozoário foi isolado em roedores silvestres, os quais, posteriormente, foram classificados como reservatórios naturais da doença. A *Leishmania* isolada nestes mamíferos poderia infectar o homem. Entretanto, suas características eram diferentes das observadas na *Leishmania brasiliensis* e muito similar aos aspectos biológicos apresentados pelos parasitos encontrados na América Central (*Leishmania mexicana*) daí a denominação de *Leishmania mexicana amazonensis* por Lainson e Shaw (1972) (LAINSON, 2010).

2.2 Agente Etiológico

2.2.1 Taxonomia

Os agentes causadores das leishmanioses são parasitos digenéticos, unicelulares eucarióticos, pertencentes ao Reino Protista, Haeckel, 1866; Sub-reino Protozoa, Goldfuss, 1817; ordem Kinetoplastida, Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976; Subordem Trypanosomatina, Kent, 1880; família Trypanosomatidae, Doflein, 1901, emend. Grobben, 1905 e Gênero *Leishmania*, ROSS, 1903 (**FIGURA 2**) (LEVINE, 1980; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Posteriormente, o gênero *Leishmania* foi subdividido em dois subgêneros: *Leishmania* (ROSS, 1903) e *Viannia* (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987). Esta divisão foi baseada no desenvolvimento do parasito no vetor, onde as leishmanias classificadas no subgênero *Leishmania* apresentam desenvolvimento na porção média e anterior do intestino do flebotomíneo (seção *Suprappylaria*). Já as espécies do subgênero *Viannia*, desenvolvem-se tanto nas partes anterior e média, como também no intestino posterior, na região do piloro do inseto (seção *Peripylaria*) (LAINSON, 2010; GUIMARÃES, 2011). Atualmente, estes dois subgêneros também foram organizados em 10 complexos como descrito no **QUADRO 1**.

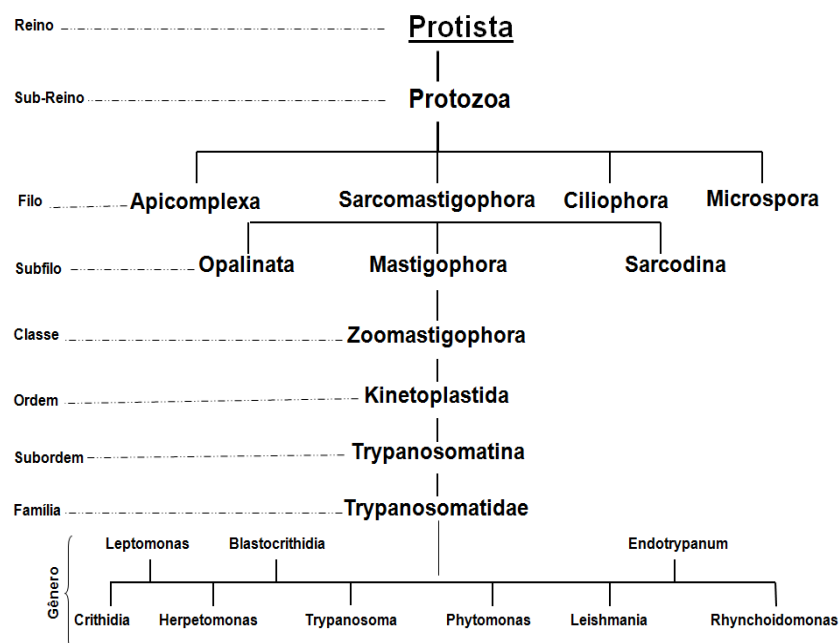


FIGURA 2. Classificação Taxonômica da *Leishmania*. Modificação do Livro de parasitologia humana (Neves, 2005)

Quadro 1. Classificação Taxonômica dos complexos de <i>Leishmania</i> em seus subgêneros		
Subgênero <i>Leishmania</i> (Ross, 1903).	Complexo <i>L. donovani</i>	<i>L. archibaldi</i> <i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i>
	Complexo <i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
	Complexo <i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>
	Complexo <i>L. aethiopica</i>	<i>L. aethiopica</i>
	Complexo <i>L. major</i>	<i>L. major</i> <i>L. cf. major</i> ou <i>L. major-like</i>
	Complexo <i>L. mexicana</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>L. enriettii</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i>
Subgênero <i>Viannia</i> (Lainson e Shaw, 1987).	Complexo <i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. colombiensis</i> <i>L. equatorensis</i> <i>L. peruviana</i>
	Complexo <i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i>
	Complexo <i>L. naiffi</i>	<i>L. naiffi</i>
	Complexo <i>L. lainsoni</i>	<i>L. lainsoni</i>

Fonte: Retirado de Alcântara (2006) - Adaptação dos dados apresentados pelo Centro Nacional de Informação em Biotecnologia – NCBI (USA, 2006) e classificação simplificada de Rioux e colaboradores (1990) apud MILES e colaboradores (2006).

2.2.2 Morfologia da *Leishmania*

O gênero *Leishmania* apresenta duas formas principais de estágios no seu ciclo biológico: uma denominada de promastigota, extracelular, móvel, com presença de flagelo, encontrada no trato digestivo do inseto vetor e em meios de culturas artificiais. A outra forma chamada de amastigota, não é móvel e reside dentro de macrófagos dos hospedeiros vertebrados. Ambas as formas evolutivas apresentam grandes semelhanças morfológicas entre as espécies do gênero (GRIMALDI JR. et al., 1991; CUPOLILLO et al., 2000).

As amastigotas têm corpo celular pequeno medindo aproximadamente 1,5-3,0 x 3,0-6,5 µm, são arredondadas ou ovóides, intracelulares obrigatórios que infectam células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) de mamíferos (REY, 2001) (**FIGURA 3A**). Apresentam um único núcleo grande e arredondado que pode chegar a ocupar dois terços ou até a metade do corpo celular. No citoplasma, há uma mitocôndria que se estende ao longo do corpo celular, que em determinada porção, próximo ao corpo basal, possui uma estrutura denominada de

cinetoplasto. Este arranjo complexo de DNA mitocondrial pode ser apresentar de aspecto baciliforme, reto ou curvo, que fica quase sempre tangente ao núcleo e perpendicular à base do flagelo. O flagelo, nesta forma, é rudimentar, internalizado e mantido na bolsa flagelar, visualizado apenas em microscópio eletrônico de transmissão (SOUZA et al., 1997; CAVALCANTI et al., 2008).

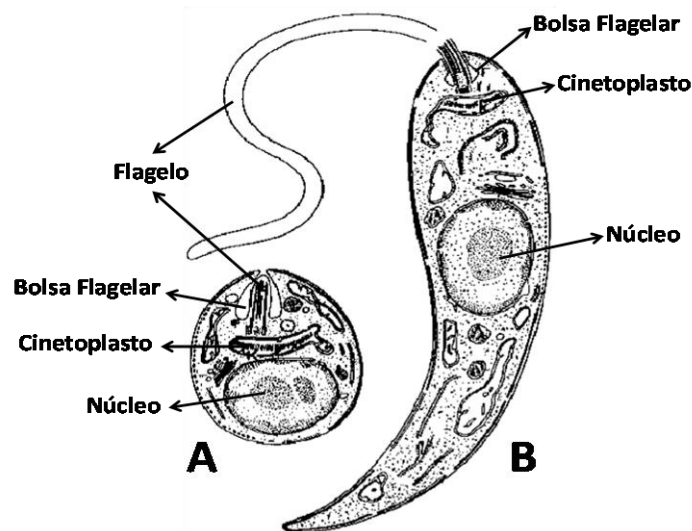


FIGURA 3. Representação esquemática da estrutura das fases evolutivas da *Leishmania*. (A) forma amastigota, (B) forma promastigota. Modificado de Rey, 2001

As promastigotas têm um comprimento entre 16-40 μm de comprimento por 1,5-3,0 μm de largura com um corpo celular fusiforme e alongado. Apresentam um longo flagelo que emerge de uma bolsa flagelar (pequena invaginação na região anterior do parasito). Ele é responsável pela mobilidade e fixação do parasito no epitélio digestivo do hospedeiro invertebrado (PESSOA; MARTINS, 1988) (**FIGURA 3B**). A estrutura deste flagelo é típica de um axonema eucariótico com o característico arranjo de microtúbulos ligados à dineína. O núcleo do protozoário é arredondado ou oval e está situado na porção mediana ou anterior do corpo celular. As estruturas moleculares citadas anteriormente para as formas amastigotas são essencialmente as mesmas encontradas nas formas promastigotas (SILVA, 2003).

2.2.3 Ciclo Biológico

As fêmeas dos flebotomíneos são as responsáveis pela transmissão da LTA quando realizam o repasto sanguíneo nos mamíferos. A alimentação de sangue serve de fonte proteica e de aminoácidos essenciais para o desenvolvimento dos ovos (BRAZIL; BRAZIL, 2003; BRASIL, 2007a). O aparelho bucal deste díptero é muito curto e adaptado para dilacerar o

tecido do hospedeiro para conseguir o seu alimento. Durante a picada, são produzidas micro hemorragias dentro da pele que formam verdadeiras “bolsas de sangue” por onde é retirado o alimento, este processo de alimentação é denominado de telmatofagia (NEVES, 2005; BATES 2007).

A picada do inseto e os componentes presentes na saliva do flebótomo funcionam como indutores da resposta inflamatória, estimulando a migração dos fagócitos polimofonucleares, macrófagos residentes, células dendríticas e monócitos (ANDRADE et al., 2007). Caso o vetor esteja se alimentando de sangue de um mamífero infectado, ele pode ingerir *Leishmanias* livres ou células infectadas com formas amastigotas (SILVA, 2003). O sangue ingerido vai para o intestino médio do flebótomo, que é prontamente envolvido por uma estrutura quitinosa (Matriz peritrófica). Após 18 a 24 horas, as formas amastigotas iniciam um processo denominado de metaciclogênese (BATES, 2006). Transformam-se em flagelados pequenos e ovóides, pouco móveis (paramastigotas), que após 72 a 96 horas desenvolvem-se em formas promastigotas delgadas e alongadas (promastigotas procíclicas). Com a degradação do sangue as formas paramastigotas e promastigotas procíclicas se aderem as microvilosidades intestinais do vetor por meio de lipofosfoglicano (LPG) presente em seus flagelos (RANGEL; LAINSON, 2003; NEVES, 2005). Sob a influência da mudança de pH, das ações enzimáticas, da eliminação da hemina e do esgotamento de nutrientes, ocorre a diferenciação das formas procíclicas em formas promastigotas metacíclicas infectantes, terminando o processo de metaciclogênese. Depois, estas formas infectantes se desprendem da parede intestinal, migram para porção anterior do aparelho digestivo, instalam-se na região da válvula estomodeal (cárdia) promovendo a destruição da mesma (VOLF et al., 2004, BATES, 2007). Posteriormente, segue para faringe, cibário e probócide. Todo este processo leva de seis a quatorze dias dependendo da espécie vetora (MARCOS, 2009).

Com a destruição da cárdia, o inseto, ao tentar sugar sangue no hospedeiro vertebrado, pode regurgitar parte do conteúdo intestinal, carreando leishmanias que estão na porção anterior do intestino, infectando o hospedeiro. Adicionalmente, devido a grande quantidade de parasito presente na porção anterior do intestino, o vetor é induzido a realizar mais repastos sanguíneos, elevando a possibilidade de contaminar outros indivíduos (NEVES, 2005). Durante o repasto sanguíneo, os flebôtomos infectados liberam juntamente com a saliva, formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* no tecido do hospedeiro vertebrado (GARCÍA-ALMAGRO, 2005; PIRES et al., 2012). No tecido estas formas promastigotas resistem à ação das proteínas do complemento e à ação lítica dos macrófagos graças à presença do LPG e substâncias presentes na saliva do inseto vetor. As promastigotas aderem à

membrana citoplasmática das células de defesa (macrófago) através de receptores específicos, para posteriormente serem endocitadas, na tentativa de escapar da destruição extracelular, pelas células da resposta imune inata e consequente estimulação da resposta imune mediada por células, tipo Th1, do hospedeiro vertebrado (PIRES et al., 2012). A endocitose pode ocorrer diretamente através das proteínas de superfície do protozoário (LPG e gp63) ou indiretamente através das proteínas existentes no soro como a C3b e C3bi que se ligam aos receptores CR1 e CR3 da membrana celular do macrófago. As proteínas de superfície da *Leishmania* são, também, capazes de inibir a produção dos subprodutos da explosão respiratória (radicais livres, óxido nítrico e hipoalóides). No interior da célula hospedeira, forma-se o vacúolo parasitóforo e neste novo ambiente as promastigotas se transformam em formas arredondadas e “sem flagelos” (amastigotas) para adaptar-se a esta novas condições (REIS et al., 2006; GUIMARÃES, 2011). A gp63, uma metaloprotease, é capaz de degradar as enzimas lisossomais da célula mantendo o ambiente do vacúolo favorável para a multiplicação do protozoário até o rompimento da membrana de célula hospedeira com liberação destas formas para o meio extracelular, infectando rapidamente outras células no tecido (NEVES, 2005; PIRES et al., 2012). A **FIGURA 4** ilustra o ciclo biológico da *Leishmania*.

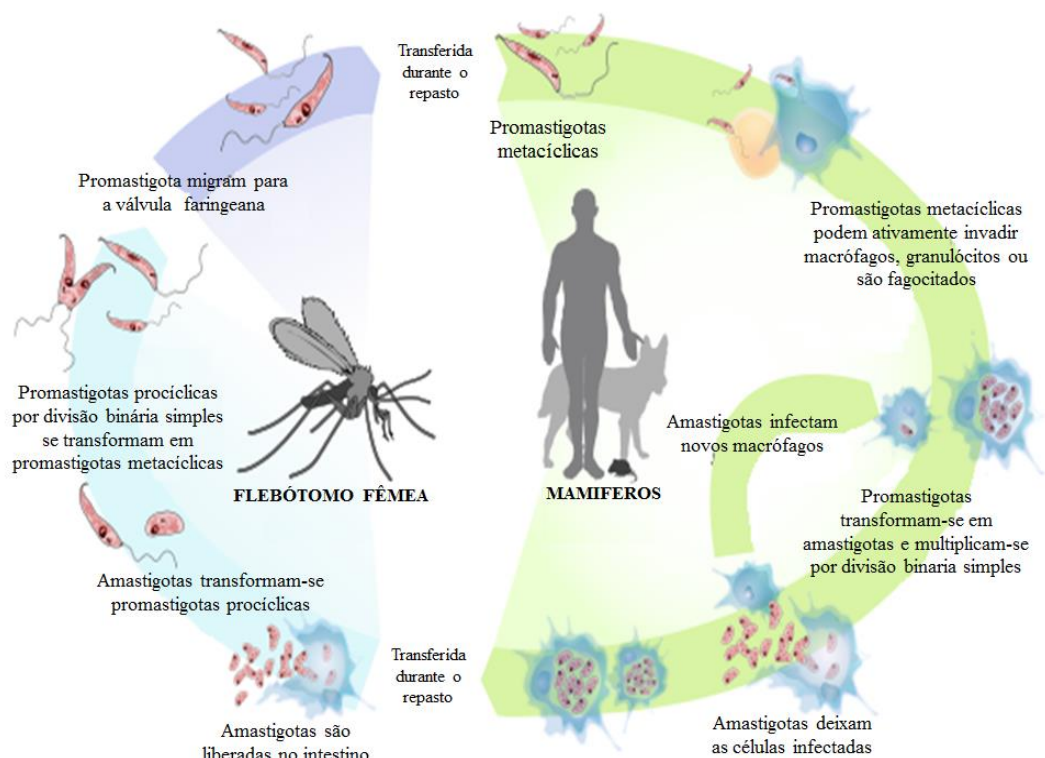


FIGURA 4. Ciclo biológico da *Leishmania* spp. modificada de http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg

2.3 Flebotomíneos como vetores das leishmanioses

Os primeiros registros dos flebotomíneos datam desde o cretáceo inferior (LEWIS, 1982; ALCÂNTARA, 2006). Contudo, a descrição formal ocorreu somente em 1907, com Coquillett catalogando duas espécies: o *Flebotomus cruciatus* e o *Flebotomus vexator* (YOUNG; DUNCAN, 1994). Nas Américas, até meados de 1940, só haviam sido descritas 33 espécies (RANGEL; LAINSON, 2003). A partir da década de 40, uma revolução de descrições foi iniciada, resultando em mais de 900 espécies ou subespécies e 22 fósseis descritos em todo mundo, dos quais aproximadamente 500 espécies e 16 fósseis ocorrem na América Latina (BATES, 2007; SHIMABUKURO; GALATI, 2011).

Na literatura, estes dípteros são referidos como flebotomíneos ou apenas flebótomos. No Brasil, são apelidados com nomes de “cangalhinha”, “asa branca”, “tatuquira”, “asa dura”, “birigui”, “mosquito-palha”, “mosquito do rio”. Apesar de algumas vezes receberem denominação de mosquito, estes dípteros não pertencem à família Culicidae (BRASIL, 2007a; ANDRADE, 2010). Os flebotomíneos são pertencentes à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e é composta dos gêneros: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* (França; Parrot, 1920) e *Chinius* (Leng, 1987) presentes nos países do Velho Mundo; *Lutzomyia* (França, 1924), *Brumptomyia*, (França; Parrot, 1921), *Warileya* (Hertig, 1984) e *Hertigia* (Fairchild, 1949) identificados nos países do Novo Mundo (YOUNG; DUNCAN, 1994; ANDRADE, 2010). Destes gêneros os de maior importância médica são *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, devido a sua capacidade de transmitir as leishmanias e ter ampla distribuição geográfica (GUIMARÃES, 2011). Estes dípteros são holometábolos, tendo em seu ciclo vital uma fase de ovo, uma fase de larva (com quatro estágios), uma fase de pupa, culminando com o adulto alado (BRAZIL; BRAZIL, 2003). As larvas são esquabraqüeadas e de aspecto vermiforme, possuem 12 segmentos (3 torácicos e 9 abdominais) e são cobertas de cerdas (**FIGURA 5A**). Diferentemente das larvas dos culicídeos, desenvolvem-se e alimentam-se de matéria orgânica depositada no solo. São de tamanhos diminutos e bastantes móveis, o que dificulta o seu encontro mesmo em locais onde haja grande quantidade da forma adulta (BRAZIL; BRAZIL, 2003). Apesar desta dificuldade, já foram encontradas em construções abandonadas, porões de casas, fendas do chão e paredes, tocas de animais, debaixo de pedras, aterros, formigueiros, cavernas e raízes tubulares (FELICIANGELLI, 2004). Os adultos de ambos os sexos se alimentam de seivas vegetais, secreções açucaradas de afídeos ou outros homópteros. Somente as fêmeas realizam hematofagia, atividade importante para a maturação dos ovos. Morfologicamente, os adultos são insetos de pequeno porte medindo de 1 a 4 mm de

comprimento, com corpo densamente coberto por pêlos. Quando vivos, e em repouso, exibem uma posição característica com as asas mantidas divergentes e semieretas (**FIGURA 5B**). Seus voos são curtos e baixos, caracterizando-se por um aspecto saltitante em um raio de ação inferior a 200 metros (REY, 2001). Estes dípteros têm hábitos crepusculares e noturnos, embora algumas espécies possam também ter hábitos matutinos e vespertinos quando no interior das matas (FORATTINI, 1973).

Em relação à preferência alimentar, os flebotomos da América Latina que se alimentam de animais de sangue quente são normalmente ecléticos. Algumas espécies capturadas com isca humana são capazes de fazer hematofagia em aves, canídeos e outros animais com a mesma avidez quando estão no mesmo ambiente. Outros podem invadir o ambiente antrópico, adaptando-se em abrigos de animais e invadindo domicílios para sugar o homem (RANGEL et al., 1986). Portanto, das 500 espécies de flebotomíneos encontradas nas Américas, aproximadamente 40 estão envolvidas na transmissão das leishmanioses. Destas, 23 espécies são suspeitas ou incriminadas na transmissão da *Leishmania* spp. em humanos (**QUADRO 2**). Tal fato é comprovado através das características antropofílicas, identificação da infecção natural e na distribuição espacial e sazonal, associadas ao registro de casos humanos ou incriminadas por evidências epidemiológicas, acrescidas ou não da infecção natural pelos parasitos (KILLICK-KENDRICK, 1990).

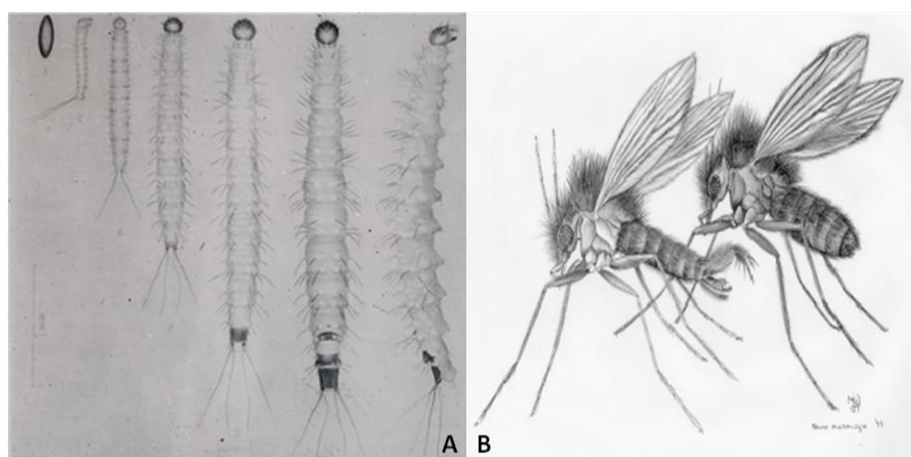


FIGURA 5. Fotos dos estágios dos flebotomíneos. (A) Larva e seus estágios. (B) Fêmea e macho adulto. Fonte: Figura 5A - REY, 2001, NEVES, 2005 e Figura 5B - [http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=2284&sid=9&tpl=printer view](http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=2284&sid=9&tpl=printer_view). Acessado em 20.11.2012)

Quadro 2. Espécies de flebotomíneos incriminados como vetores da LTA no Brasil e seus respectivos habitats	
Espécie de flebotomíneos	Habitat
<i>Lutzomyia anduzei</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tronco de árvores e raízes tubulares; Áreas marginais; Abrigos de animais domésticos.
<i>Lutzomyia antunesi</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tocas de tatus e de outros animais silvestres; Tronco de árvores e raízes tubulares; Copas das árvores; Áreas marginais; Abrigos de animais domésticos.
<i>Lutzomyia ayrozai</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Folhas caídas no solo florestal; Tronco de árvores e raízes tubulares; Áreas marginais.
<i>Lutzomyia complexa</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Floresta (sem notificação do local).
<i>Lutzomyia cruzi</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fendas das rochas; Grutas; Abrigos de animais domésticos; Parede externa e interna de domicílio humano.
<i>Lutzomyia davisi</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Folhas caídas no solo florestal; Tocas de tatus; Tocas de outros animais silvestres; Tronco de árvores e raízes tubulares; Áreas marginais; Parede externa e interna de domicílio humano.
<i>Lutzomyia fischeri</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tronco de árvores e raízes tubulares; Ocos de árvores; Copas das árvores; Áreas marginais; Abrigos de animais domésticos; Parede externa e interna de domicílio humano.
<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tronco de árvores e raízes tubulares; Folhas caídas no solo florestal; Tocas de tatus; Abrigos de animais domésticos; Parede externa e interna de domicílio humano.
<i>Lutzomyia hirsuta hirsuta</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tronco de árvores e raízes tubulares; Tocas de outros animais silvestres; Copas das árvores; Áreas marginais,
<i>Lutzomyia intermedia</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Floresta (sem notificação do local); Áreas marginais; Abrigos de animais domésticos; Parede externa e interna de domicílio humano.
<i>Lutzomyia migonei</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tronco de árvores e raízes tubulares; Ocos de árvores; Fendas das rochas; Áreas marginais; Abrigos de animais domésticos; Parede externa e interna de domicílio humano.
<i>Lutzomyia olmeca bicolor</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Folhas caídas no solo florestal; Tronco de árvores e raízes tubulares; Ocos de árvores.
<i>Lutzomyia olmeca nociva</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Folhas caídas no solo florestal.
<i>Lutzomyia paraensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tocas de tatus; Abrigos de animais domésticos.
<i>Lutzomyia pessoai</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tronco de árvores e raízes tubulares; ocos de árvores; Copas das árvores; Áreas marginais; Abrigos de animais domésticos; Parede externa e interna de domicílio humano.
<i>Lutzomyia squamiventris</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Floresta (sem notificação do local); Abrigos de animais domésticos; Parede externa e interna de domicílio humano.
<i>Lutzomyia ubiquitalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tocas de tatus e de outros animais silvestres; Tronco de árvores e raízes tubulares; Ocos de árvores.
<i>Lutzomyia umbratilis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tronco de árvores e raízes tubulares; Copas das árvores.
<i>Lutzomyia wellcomei</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Floresta (sem notificação do local).
<i>Lutzomyia whitmani</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tronco de árvores e raízes tubulares; Ocos de árvores; Copas das árvores; Áreas marginais; Abrigos de animais domésticos; Parede externa e interna de domicílio humano.
<i>Lutzomyia gomezi</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tocas de outros animais silvestres; Tronco de árvores e raízes tubulares; Ocos de árvores; Copas das árvores; Abrigos de animais domésticos Parede externa e interna de domicílio humano.

Fonte: Adaptado dos dados de Rangel; Lainson, 2003; BRASIL, 2007a; Rangel; Laison, 2009.

2.4 Ciclo de transmissão das leishmanias

A LTA pode ser considerada uma enfermidade de caráter complexo, pois o ciclo de transmissão varia de acordo com a região geográfica, espécie de parasito, vetores, reservatórios e hospedeiros. Na América Latina, atualmente, são reconhecidas quatorze espécies dermatrópicas de *Leishmania* que causam doenças em humanos e oito espécies descritas acometendo somente animais. No Brasil, sete espécies de *Leishmania* são incriminadas em causar LTA em humanos, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*, que apresentam os seguintes ciclos de transmissão (BRASIL, 2007b; BACHA, 2009).

A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* está distribuída principalmente na América do Sul (Bolivia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru e Venezuela) (GRIMALDI; TESH; McMAHON-PRATT, 1989). Em território brasileiro foi encontrada em áreas de florestas primárias e secundárias da Amazônia Legal e em alguns estados do Nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Goiás), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Sul (Paraná) (BRASIL, 2007a; COELHO, 2010). A transmissão desta espécie está associada a presença de roedores selvagens terrestres (*Proechimys guyanensis*, *Oryzomys capito*, *Oryzomys goeldii*, *Nectomys*, *Neacomys* e *Dasyprocta prymnolopha*); marsupiais (*Marmosa murina* e *Marmosa cinerea*, *Didelphis marsupialis* e *Didelphis albiventris*) e carnívoros silvestres (*Cerdocyon thous*) (GRIMALDI; TESH; McMAHON-PRATT, 1989). *Lutzomyia flaviscutellata* (principal vetor), *Lutzomyia olmeca olmeca*, *Lutzomyia olmeca nociva*, e *Lutzomyia reducta* são considerados vetores desta espécie. Estes dípteros possuem voo baixo e são pouco antropofílicos, preferindo fazer o repasto nos roedores terrestres, sendo por isto o maior número destes reservatórios encontrados infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e mais raramente os humanos (LAINSON, 2010) (**FIGURA 6**).

A espécie com maior número de casos identificados de LTA no novo mundo é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Ela já foi descrita desde o México até a Argentina (BRASIL, 2007a; MARTINS; ALEXANDRINO; GUIMARÃES, 2010). No país, já foi registrada em todas as unidades federativas, tanto em área de colonização recente na Amazônia, quanto em áreas antigas do Nordeste, Centro Oeste, Sudeste e Sul apresentando diversidade de flebotomíneos na transmissão. Sua ocorrência foi descrita em vegetações primitivas, áreas rurais com vegetação primária modificada no domicílio e peridomicílio em abrigos animais como galinheiros e chiqueiros (BRASIL, 2007b). As espécies vetoras indicadas na transmissão são: *Lu. whitmani*, *Lu. neivai*, *Lu. intermedia*, *Lu. umbratilis*, *Lu.*

migonei, *Lu. fischeri*, *Lu. wellcomei*, *Lu. pessoai*, *Lu. complexa* e *Lu. hirsuta hirsuta* (RANGEL; LAINSON, 2003; RANGEL; LAINSON, 2009; LAINSON, 2010). Os reservatórios e hospedeiros naturais silvestres são os roedores (*Oryzomys concolor*, *Oryzomys. capito*, *Oryzomys. nigripes*, *Bolomys lasiurus*, *Akodon arviculoides*, *Proechimys* spp, *Rhipidomys leucodactylus*, *Rattus rattus* e *Sigmodon hispidus*) (LAINSON, 2010); gambás (*Didelphis marsupialis*); e bicho preguiça (*Choloepus didactylus*) (LIMA, 2010a). Na área peri-urbana e rural, essa espécie foi detectada infectando roedores sinantrópicos (*Rattus rattus*), felinos (*Felis catus*), cães (*Canis familiaris*) e equídeos (*Equus caballus*, *Equus asinus*) (GRIMALDI; TESH; McMAHON-PRATT, 1989). A **FIGURA 7** resume o ciclo de transmissão da *Leishmania (Viannia) braziliensis* na região amazônica.



FIGURA 6. Ciclo de Transmissão da *Leishmania Leishmania amazonensis*, na região Amazônica do Brasil. (1) O hospedeiro principal (*Proechimys* spp). (2) Hospedeiros secundários (marsupiais, roedores e raposas). (a). O homem é um hospedeiro acidental, e (v). Vetor principal (*Lutzomyia flaviscutellata*). Fonte: (Lainson et al., 1986)

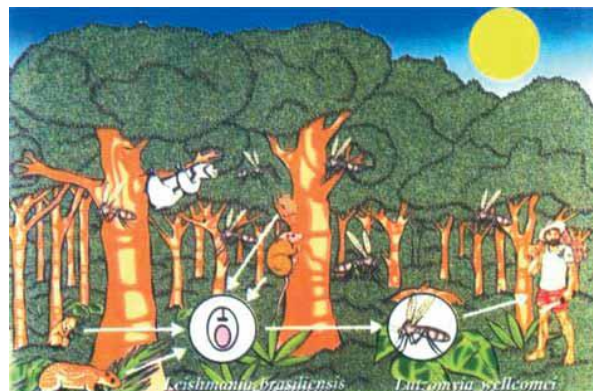


FIGURA 7. Ciclo de Transmissão da *Leishmania Viannia braziliensis*. Fonte: (BRASIL, 2007a)

No Brasil, acredita-se que o ciclo de transmissão da *Leishmania (Viannia) guyanensis* ocorra somente na região Norte em florestas de terra firme em áreas que não se alagam no período das chuvas (ROMERO et al., 2002a; BRASIL, 2007a). O principal vetor da transmissão desta espécie é o *Lu. umbratilis*. O *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani* também foram relacionados em casos esporádicos de transmissão (LAINSON; WARD; SHAW, 1976; RANGEL; LAINSON, 2009). O parasito foi isolado em mamíferos silvestres como roedores (*Proechimys* sp), jupurás (*Potos flavus*), bicho preguiça (*Choloepus didactylus*), tamanduá (*Tamandua tetradactyla*) e gambá (*Didelphis albiventris*) (PAJOT et al., 1982; BACHA, 2009) (**FIGURA 8**).

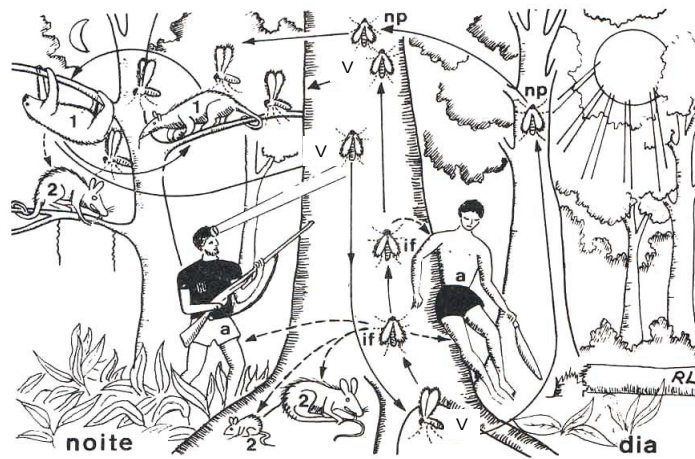


FIGURA 8. Ciclo de transmissão da *Leishmania guyanensis* na Amazônia. (1) Hospedeiros principais (preguiça e tamanduá). (v) *Lutzomyia umbratilis* (vetor principal). (2) Hospedeiros secundário (roedores) e homem (a). Fonte: (LAINSON et al., 1986)

Outra espécie causadora de LTA humana é a *Leishmania (Viannia) naiffi*. Esta espécie foi isolada na Guiana Francesa e alguns estados da região Norte do Brasil. Poucos relatos de casos humanos foram detectados no país. Esta baixa ocorrência de número de casos de LTA em humanos, deve-se, possivelmente, pela principal espécie transmissora, *Lu. ayrozai*, ser pouco antropofílica. Entretanto, as espécies altamente antropofílicas, *Lu. paraensis* e *Lu. squamiventris*, foram encontradas infectadas com o parasito. Em relação ao reservatório animal, o único animal encontrado infectado com a *Leishmania (Viannia) naiffi* foi o tatu galinha (*Dasypus novemcinctus*). E, devido a sua ampla distribuição no território nacional, acredita-se que possam existir mais casos de LTA causada por *L.(Viannia) naiffi*. (NAIFF et al, 1991; LAINSON, 2010)

A *Leishmania (Viannia) shawi* foi encontrada distribuída em algumas áreas do Amazonas, do Pará e do Maranhão (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Tem como hospedeiros primários: primatas - o macaco prego (*Cebus apella*), cuxiú (*Chiropotes satanas*); quati (*Nasua nasua*) e bicho preguiça (*Choloepus didactylus*) (LAINSON et al., 1989; COELHO, 2010). Como estes animais de características arborícolas, acredita-se que o ciclo enzoótico aconteça neste ambiente, porém no homem acontece no solo. O único vetor incriminado na transmissão da *Leishmania (Viannia) shawi* foi a *Lu. whitmani* (LAINSON; SHAW, 1988).

O ciclo de transmissão da *Leishmania (Viannia) lainsoni* foi identificado nos estados do Amapá, Acre, Pará e Rondônia, (BRASIL, 2007a, BACHA, 2009), sendo que o único animal encontrado infectado agindo como reservatório foi a paca (*Agouti paca*) (SILVEIRA et al., 1991a). Até o momento, o único vetor incriminado e encontrado com a *L. (V) lainsoni* foi o *Lu. ubiquitalis*, que é um díptero de baixa capacidade antropofílica (SILVEIRA et al., 1991b).

A sétima espécie identificada causando LTA em humanos foi a *Leishmania (Viannia) lindebergi*. Esta espécie foi encontrada apenas em florestas secundárias no Pará em soldados que realizavam treinamentos militares (SILVEIRA et al., 2002). Supõe-se que o *Lu. antunesi* seja o responsável pela transmissão desta espécie de *Leishmania*, uma vez que é antropofílico de voo baixo e foi encontrado em maior quantidade nas áreas onde soldados foram infectados. Além disso, não se sabe qual animal poderia funcionar como reservatório, mas suspeita-se que animais terrestres como paca (*Agouti paca*) e tatu galinha (*Dasypus novemcinctus*) poderiam desempenhar esta função (LAINSON, 2010).

2.5 Características clínicas da LTA

A Leishmaniose, em sua variedade de manifestações clínicas, está presente em todos os continentes exceto Austrália e Antártida. Clinicamente, pode se apresentar desde uma lesão simples na pele com cura espontânea até em uma forma visceral, que pode levar a morte caso não seja tratada (BRYCESON, 1996). A forma cutânea, endêmica na América Latina, pode se manifestar sob duas formas clássicas: leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa, denominadas de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). A apresentação desta enfermidade, normalmente, ocorre como uma lesão simples e única que aparece em áreas do corpo descoberto de vestimentas, fáceis do flebotomíneo picar (orelhas, rosto, pescoço e membros) (REY, 2001). As lesões levam em média de duas semanas a três meses para aparecer após a picada do inseto, mas já houve relatos de indivíduos com lesões de dias ou até um ano (NEVES, 2005). A doença apresenta

uma diversidade de fatores que podem interferir na apresentação clínica, tanto que alguns autores propuseram uma classificação baseada na fisiopatogenia, aspecto e localização das lesões com ou não linfadenopatias e resposta imunológica, ampliando o número de formas clínicas observadas nesta enfermidade como demonstrado na **FIGURA 9** (BRASIL, 2007a).

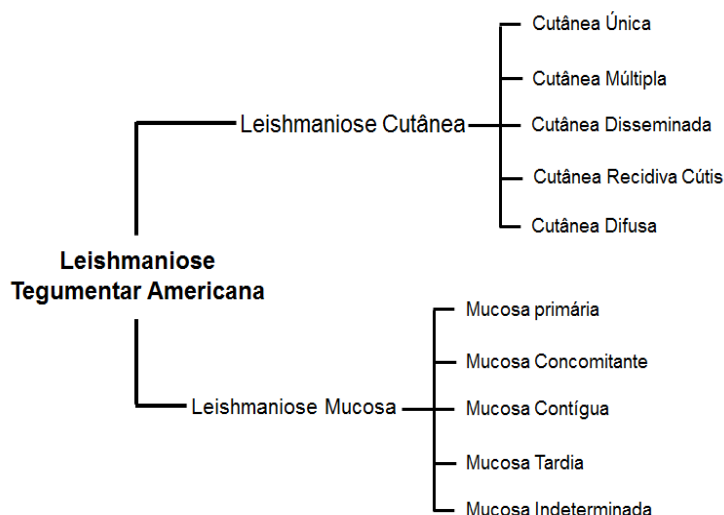


FIGURA 9. Classificação clínica da Leishmaniose Tegumentar Americana. Adaptado de BRASIL, 2007a.

2.5.1 Leishmaniose Cutânea

A Leishmaniose Cutânea Localizada pode se apresentar como lesão única ou múltiplas lesões, que surgem, normalmente, no local da(s) picada(s). Inicialmente surge uma pápula vermelha, que progride lentamente a uma placa, nódulo, ou, mais frequentemente, para uma úlcera indolor, que é circundada por uma borda violácea. Quando formada a úlcera, esta apresenta uma base granulomatosa e crostosa, com margens hipertróficas e elevadas podendo ou não se observadas secreções no centro da úlcera (**FIGURA 10A**) (REY, 2001; BRASIL, 2007a; BARRAL; COSTA, 2011). Adicionalmente, nos casos com infecções secundárias são visualizadas secreções purulentas e dor ao toque. Já, em outros casos, podem ser detectados um polimorfismo das lesões, com observação de formas impetigóide, liquenóide, tuberculosa ou lupóide, nodular, vegetante e ectimatóide que são diferentes da lesão clássica da LTA (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Além disso, podem aparecer em torno da úlcera, nódulos subcutâneos ou nódulos elásticos indolores, causados pela propagação da linfangite local (GREVELINK; LERNER, 1996). A lesão cutânea única pode ser causada por qualquer uma das sete espécies dermatrópicas que acometem o ser humano. Nesta forma de apresentação, ocorre o comprometimento primário da pele, com tendência a cura espontânea e boa resposta

ao tratamento (BRASIL, 2007b). A Lesão múltipla é outra forma cutânea, frequentemente, causada por *L.(V) guyanensis*, possivelmente pela picada simultânea de vários flebótomos infectados ou devido a metástases linfáticas (COELHO, 2010). Ambas as formas apresentam na fase clínica da doença uma riqueza parasitária que pode ser visualizada no teste parasitológico direto. E, normalmente é reativa no teste de Intradermorreação de Montenegro (IDRM).

Outra forma clínica de apresentação da LTA é Leishmaniose Cutânea Recidiva Cútis, também denominada de Leishmaniose Recorrente, é caracterizada pelo desenvolvimento de novas lesões no centro ou periferia de uma cicatriz de uma lesão de LTA cicatrizada espontaneamente ou por ação medicamentosa (GREVELINK; LERNER, 1996). Os organismos causadores de forma clínica, na América do Sul, são *L.(V) braziliensis* e, secundariamente, a *L. (L). amazonensis*. Clinicamente, apresenta-se como pápulas escamosas, eritematosas, lesões psoríasisiformes ou verrucosas, que se limitam dentro ou contiguamente a área das cicatrizes de lesões curadas (**FIGURA 10B**). As lesões tendem a resistir ao tratamento convencional e se tornar crônicas (GREVELINK; LERNER, 1996).

A Leishmaniose Cutânea Disseminada é caracterizada pela presença de lesões que variam de 11 a centenas de aspecto papulosa ou acneiforme, localizadas na face, tronco e membros (CARVALHO et al., 1994; BARRAL; COSTA, 2011) (**FIGURA 10C**). A princípio acreditava-se que esta forma clínica estivesse associada somente à *L. (L) amazonensis*, porém, recentemente, observou-se que a maioria dos casos são causados pela *L. (V) braziliensis* (BACHA, 2009). Esta forma apresenta inicialmente uma única lesão, que se dissemina subitamente por via hematogênica ou linfática por todo o corpo. Consequentemente, os pacientes podem apresentar febre e astenia (GUIMARÃES et al., 2005). Nesta forma clínica pode ocorrer regressão da maioria das lesões mesmo sem realizar tratamento, contudo, sem cura clínica. No tratamento convencional, a cura também raramente é atingida, e no paciente podem persistir algumas lesões (GUIMARÃES et al., 2005). Outra complicação é o comprometimento mucoso que pode ocorrer em 38% dos casos não tratados (SILVEIRA et al, 1991c). Além disso, o parasitológico direto, geralmente, é positivo, mas sua parasitemia é mais baixa quando comparada com a Leishmaniose Cutânea Difusa. O teste intradérmico de Montenegro (IDRM) apresenta resultado variável (BARRAL; COSTA, 2011).

A forma mais rara da LTA é a Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), também chamada de Leishmaniose Anérgica, caracteriza-se por apresentar aspecto clínico, imunológico, parasitológico e terapêutico diferente de outras formas da LTA. No Brasil, esta doença é exclusivamente causada pela *L.(L) amazonensis* (SILVEIRA, 2009; COSTA et al., 2009;

BARRAL; BARRAL-NETO, 2009). Inicialmente, surge uma mácula, pápula ou nódulo no local da inoculação, que raramente ulcera, evoluindo com o aparecimento de outras lesões semelhantes na vizinhança. Posteriormente, ocorre disseminação hematogênica do parasito após meses ou anos. Consequentemente, surgem lesões que ocupam praticamente todo o corpo excetuando couro cabeludo, regiões inguinocrurais, axilares e palmares (SILVEIRA, 2009). As lesões apresentam-se como eritemas, pápulas, tubérculos, nódulos, infiltrações difusas e aspecto tumoral (**FIGURA 10D**). A infiltração pode envolver extensas áreas do corpo e quando presente na face confere ao paciente aspecto leonino, lembrando a forma virchowiana da hanseníase (COSTA et al., 2009). O comprometimento raramente ocorre nas mucosas e quando acontece é por contiguidade da lesão cutânea (BARRAL; COSTA, 2011). Outra característica evidente da LCD é a grande parasitemia observada mesmo em lesões crônicas, que bastante evidenciada no parasitológico direto. Diferentemente, IDRM não é reagente, mesmo depois de repetidas aplicações (BARRAL; BARRAL-NETO, 2009).



FIGURA 10. Tipos de Lesões cutânea da LTA. (A) Cutânea com lesão clássica; (B) Cutânea Recidiva cutis; (C) Cutânea Disseminada, e; (D) Cutânea Difusa. Fonte: Adaptada de GUIMARÃES et al., 2005 e BRASIL, 2007a.

2.5.2 Leishmaniose Mucosa (LM)

A Leishmaniose Mucosa, também chamada de espúndia da LTA, é uma forma clínica muito importante na América do Sul, onde na maioria das vezes, é secundária às lesões cutâneas. Estudos relatam que 3 a 5% dos casos de LTC irão desenvolver a forma mucosa mesmo após tratamento adequado, sendo que destes, 90% ocorrerão dentro de 10 anos

(GREVELINK; LERNER, 1996; BRASIL, 2007a). Adicionalmente, os autores defendem que esta forma seja causada pela disseminação hematogênica ou linfática do parasita após inoculação na pele (REITHIGER et al, 2007). As lesões acometem, notadamente, as cavidades nasais, faringe, laringe e cavidade oral. As queixas mais comuns apresentadas são acometimento: nasal (obstrução, epístaxe, rinorréia e crostas), da faringe (odinofagia), da laringe (rouquidão e tosse) e da cavidade oral (feridas na boca). Ao exame clínico, pode-se observar nas mucosas atingidas infiltração, ulceração, perfuração da região cartilaginosa do septo nasal, lesões ulcerovegetantes, ulcero-crostosas, ulcero-destrutivas em cavidade nasal (GUIMARÃES et al., 2005).

No Brasil, a *L.(V) braziliensis* é o principal agente etiológico causador da leishmaniose mucosa. Porém, casos esporádicos, já foram relatados com infecção de *L. (V) guyanensis* e *L.(L) amazonensis* (BARRAL; COSTA, 2011; MOTA; MIRANDA, 2011). A LM é fortemente reativa IDRM e devido a escassez de parasito nas lesões, pode apresentar-se negativa ao parasitológico direto. Em relação a evolução clínica, esta geralmente não evolui para cura espontânea como na LTC e para alcançar este objetivo através do tratamento é exigido uma maior concentração da droga, que, mesmo assim, pode apresentar recidivas (em torno de 7,5% dos casos) e evolução para óbito (1% dos casos) por infecções secundárias, principalmente, do trato respiratório superior (MOTA; MIRANDA, 2011). Apesar de a LM acometer predominante a mucosa, alguns autores nominaram alguns aspectos clínico da LM de acordo com as observações da localização da lesão, evolução clínica da lesão e identificação do possível local de origem da picada do flebótomo, enumerado as seguintes formas clínicas da Leishmaniose Mucosa:

1. Mucosa Tardia - é a forma mais comum da LM, normalmente, surge anos após ter ocorrido a cicatrização de uma lesão cutânea (**FIGURA 11A**);
2. Mucosa Concomitante – é assim denominada quando a lesão mucosa surge próxima e por contato direto, a uma lesão cutânea ativa, ou seja, a lesão cutânea não está contígua com a lesão mucosa (**FIGURA 11B**);
3. Mucosa Contígua – esta forma clínica se apresenta com uma lesão mucosa, que foi originada da propagação direta de uma lesão cutânea que estava próxima aos orifícios das mucosas das vias aerodigestivas, ou seja, ela é a continuação de uma lesão cutânea em atividade ou cicatrizada (**FIGURA 11C**);
4. Mucosa Indeterminada – é uma forma clínica de lesão mucosa que não se consegue determinar alguma evidência de lesão cutânea anterior, possivelmente, porque houve infecção

subclínica com rápida cura que não deixaram cicatrizes e não foram percebidas pelo indivíduo (**FIGURA 11D**);

5. Mucosa Primária – é forma clínica em que se identifica que a lesão oriunda da picada direta do vetor na própria mucosa ou semimucosa dos lábios ou genitais (**FIGURA 11E**);



FIGURA 11. Tipos de lesões mucosas da LTA. (A) Mucosa Tardia; (B) Mucosa Concomitante; (C) Mucosa Contígua; (D) Mucosa Indeterminada; (E) Mucosa Primária. Fonte: Modificada de BRASIL, 2007a.

2.6 Diagnóstico Laboratorial

Os métodos de diagnósticos laboratoriais têm por objetivo não apenas confirmar um achado clínico, mas, também, fornecer importantes informações epidemiológicas pela confirmação das espécies circulantes, orientando quanto às medidas a serem adotadas para o controle das leishmanioses. Cada método de diagnóstico tem uma sensibilidade e especificidade que variam de acordo com a experiência de cada serviço, qualidade do equipamento e insumos utilizados, o tempo de evolução das lesões, as formas clínicas e das espécies de *Leishmania* envolvidas. Desta forma, classificaram-se as metodologias de diagnóstico das leishmanioses em três grupos: pesquisa direta do parasita, métodos imunológicos (indireto) e métodos de biologia molecular ou de identificação da espécie de *Leishmania*.

2.6.1 Pesquisa direta do parasito

A pesquisa direta do parasito consiste em demonstrar a presença de uma das formas do parasito no material obtido da lesão e pode ser feita através das técnicas de pesquisa em

lâmina corada, exames histopatológicos, isolamento em meios artificiais e inoculação em animais de laboratórios.

A pesquisa em lâmina corada consiste em coletar material das bordas das lesões podendo ser fragmentos, raspados ou mesmo aspirado do líquido intersticial. Por aposição é feito um esfregaço. Em seguida, a lâmina é submetida a uma técnica de coloração (Romanoswsky, Giemsa, Leishman ou Panótico Rápido) para a visualização das formas amastigotas livres ou no interior de macrófagos (BRASIL, 2007a). Esta é a técnica de primeira escolha e utilizada como rotina nos laboratórios de diagnóstico da rede pública, em vista de ser um procedimento rápido, de menor custo, fácil execução e não necessitar de equipamentos sofisticados. Contudo, tem como desvantagem a necessidade de um técnico treinado na visualização das formas amastigotas e a sensibilidade do teste diminui em lesões com infecções secundárias e em lesões crônicas (nos primeiros dois meses de evolução para *L.(V) brasiliensis*, a sensibilidade é de 100% e gradativamente vai diminuindo chegando a cair para 20% aos 12 meses). A técnica também não é capaz de identificar a espécie de *Leishmania* necessitando de outro método para este objetivo (FURTADO, 1980; COELHO, 2010; BARRAL; COSTA, 2011).

Outro método de identificação direta de *Leishmania* é o exame histopatológico. Este teste consiste na retirada de um fragmento da lesão (biopsia) que deve ser fixado em formalina a 10%. A metodologia exige que o material colhido deva ser embebido em parafina, posteriormente, cortado no micrótomo e corado pela técnica de Hematoxilina & Eosina (HE) (BITTENCOURT, 2009). O Objetivo desta técnica é a visualização das formas amastigotas por um patologista experiente (DUARTE; ROCHEL, 2006; BRASIL, 2007a). Da mesma forma que na pesquisa direta em lâmina o tempo da lesão vai influenciar no resultado.

A terceira metodologia de identificação direta do protozoário é o isolamento do parasito em meios de crescimento artificial. Para realização desta técnica é necessário fragmento tecidual, escarificado profundo ou aspirado da borda da lesão. O material colhido é colocado em meio de cultivo constituído de uma fase líquida. Porém, quando se deseja aumentar a sensibilidade deste teste, utiliza-se um meio mais complexo constituído de duas fases, uma contendo meio sólido (meio MacNeal, Novy, Nicolle suplementado com antibióticos) e a outra com meio de cultura líquido (Schneider, LIT ou RPMI acrescido ou não de soro fetal bovino, antibióticos e urina humana) (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Após semeio do material, o material é cultivado por até 30 dias, em temperatura de 24 a 28°C para crescimento e visualização de formas promastigotas. A vantagem deste processo é a utilização das promastigotas isoladas em outros testes como caracterização eletroforética das isoenzimas

em celulose acetato ou em biologia molecular para a identificação das espécies (NEVES, 2005). Por outro lado, apresenta, como grande desvantagem, a facilidade de contaminação do material, principalmente, em lesões com infecções secundárias. Além disso, pode-se levar até 30 dias para se ter um resultado positivo (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2006).

Além das técnicas já citadas, as amostras das lesões podem ser inoculadas em animais de laboratórios. Estes materiais da lesão obtidos por meio de biopsia ou raspado são triturados em salina estéril, posteriormente, inoculados em um animal de laboratório. Dentre os animais utilizados, o mais sensível para a maioria das espécies de *Leishmania* é o hamster (*Mesocricetus auratus*). A inoculação é realizada por via intradérmica nas patas posteriores, focinho ou orelhas. E, após a inoculação, colocam-se os animais em ambiente controlado para observação de lesões clássicas da LTC. O aparecimento das lesões pode variar de poucas semanas a até nove meses (GONTIJO; CARVALHO, 2003). A vantagem deste processo é a sua sensibilidade, pois dentre as técnicas de identificação direta do parasito é a mais sensível. A desvantagem é o tempo longo, alto custo em alimentação e manutenção dos animais e do ambiente em que estes animais vivem (BRASIL, 2007a).

2.6.2 Métodos Imunológicos (indiretos)

A Intradermorreação de Montenegro (IDRM) ainda é o método imunológico mais utilizado no Brasil. O princípio deste teste é a reação de hipersensibilidade celular tardia induzida pela administração de soluções proteicas, extratos ou promastigotas mortas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (PASSOS, 2003; NEVES, 2005). O antígeno é inoculado por via intradérmica na porção anterior do antebraço a aproximadamente três centímetros de distância da fossa cubital. Após 48 a 72 horas da administração do inóculo, é realizada a leitura e interpretação da enduração formada. O resultado é considerado reagente, quando o enduração apresentar um halo de pelo menos cinco milímetros de diâmetro (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2007a). O teste se torna reagente em aproximadamente quatro meses após o início da lesão. E, como é um teste presuntivo, ele não diferencia a doença atual, pacientes submetidos a testes anteriores de IDRM e, também, pacientes com LTA pregressa mesmo curada após tratamento (PASSOS, 2003). Em lesões cutâneas recentes com evolução menor de 2 meses, em formas cutâneas difusas e em pacientes imunodeprimidos, a IDRM, normalmente, não é reativa (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Já em lesões mucosas esta técnica é fortemente reativa chegando a ocasionar necrose no local de aplicação do antígeno (MOTA; MIRANDA, 2011).

Os testes sorológicos são técnicas utilizadas para detectar de forma indireta a *Leishmania*. Elas são baseadas na interação antígeno–anticorpo, o qual detectam imunoglobulinas específicas para um determinado antígeno do parasito. Normalmente, na fase inicial (aguda) da doença há uma maior produção de imunoglobulinas da classe IgM e a medida que a enfermidade avança, o perfil muda para a maior produção de imunoglobulinas da classe IgG (MARZOCHI; SHUBACH; MARZOCHI, 1999; ALCÂNTARA, 2006). Graças a este conhecimento, inúmeras técnicas foram elaboradas, sendo que destas o teste de aglutinação direta (DAT), o teste de avaliação rápida da aglutinação (FAST) e teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) e ELISA (“*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”) são os mais utilizados para detecção de imunoglobulinas anti-*Leishmania*.

O DAT é um teste baseado na capacidade dos anticorpos presentes no soro do pacientes reconhecerem epítomos expostos em promastigotas de *Leishmanias*, que ao se ligarem formam um complexo antígeno-anticorpo, aglutinando de forma visível sem necessidade de equipamentos mais sofisticados para a sua realização (GONTIJO; MELO, 2004). Este teste tem como desvantagens a possibilidade de apresentar falsos positivos (reações cruzadas com outros tripanossomatídeos), falsos negativos (principalmente quando é produzida pequena quantidade de anticorpos na LTC) e positividade da reação em casos de pacientes com produção de IgG por cura (seja espontânea ou após tratamento) (ALCÂNTARA, 2006).

A IFI é uma técnica que utiliza um anticorpo fluorescente executada, normalmente, em lâminas de vidros com áreas individualizadas onde são sensibilizadas com leishmanias mortas (antígenos), expostas a diluições seriadas de soro do paciente para a possível detecção de imunoglobulinas anti-*Leishmania*. Posteriormente, o anticorpo é conjugado a um fluorocromo que é visualizado em luz ultravioleta no microscópio de imunofluorescência (ALCÂNTARA, 2006). As principais desvantagens do teste é a reação cruzada com outros tripanossomatídeos, subjetividade no teste (depende muito do técnico) e certa complexidade na elaboração do teste (GONTIJO; MELO, 2004).

Outro teste sorológico, o ELISA, utiliza placas de poliestireno com 96 poços sensibilizados com antígenos de *Leishmania*. Nestas, são adicionados diluições do soro suspeito, seguidos de adição de um anticorpo conjugado a uma enzima (peroxidase), cromógeno e um substrato capaz de oxidá-lo. O complexo formado, normalmente é inserido em um aparelho capaz de emitir um comprimento de luz filtrado por filtros específicos para o cromógeno. Este aparelho é denominado leitor de ELISA (CROWTHER, 2001).

Apesar de existir inúmeros testes sorológicos, no Brasil, o Ministério da Saúde os disponibiliza para serem usados apenas para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral. Além

disso, estes testes utilizados sozinhos não devem ser critérios para a identificação da LTA, devendo-se associar outras técnicas de pesquisa direta do parasita através da punção de baço, linfonodos, medula óssea ou técnicas moleculares. Isto ocorre devido, como mencionado, a possibilidade de reações cruzadas, persistência da positividade após cura em pacientes aparentemente saudáveis e a característica de cada *Leishmania* na indução da resposta imune (DAVIES et al, 2003; PASSOS, 2003; BRASIL, 2007a).

2.6.3 Métodos de biologia molecular ou identificação da espécie de *Leishmania*

A Leishmaniose é caracterizada por apresentar vários aspectos clínicos, etiológicos e ciclos de transmissão. Esta variabilidade de fatores a torna complexa, fazendo com que a identificação das espécies de *Leishmania* seja uma importante informação para elaboração mais efetiva das medidas de vigilância, controle e avaliação terapêutica, minimizando os riscos de recidivas e apresentando melhores prognósticos (GRIMALDI; TESH; McMAHON-PRATT, 1989; SILVEIRA, et al., 1998). Visando isto, muitos métodos foram criados objetivando não somente identificar, mas, também, diferenciar as várias espécies de *Leishmania*. Dentre as técnicas desenvolvidas as mais conhecidas são: as de anticorpos monoclonais espécie-específico (GRISARD et al., 2000; SHAW; ISHIKAWA; LAINSON, 1989), análise eletroforética com isoenzimas (FIGUEIRA et al., 2008), métodos moleculares através de técnicas de PCR (SILVA et al, 2010a) e análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição do DNA (RFLP) (BENSOUSSAN et al, 2006).

A análise eletroforética de isoenzimas, também chamada de eletroforese multilocus de enzimas (*Multi Locus Enzyme Electrophoresis* - MLEE), consiste em detectar um grande número de genes estruturais, para distinguir polimorfismos entre espécies, bem como informar as diferenças na reprodução da isoenzima originada no parasito. Esta técnica utiliza um suporte físico, um gel (poliacrilamida ou agarose), por onde migram eletroforéticamente as enzimas. Os produtos da separação são chamados de *eletromorfos* e o conjunto é denominado de *zimoderma* (CUPOLILLO; GRIMALDI JR; MOMEN, 1994; KNIO et al., 2000). As desvantagens deste processo é a necessidade de grande quantidade de *Leishmania* e manutenção de espécies que funcionam como controle (ALCÂNTARA, 2006).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método molecular que mimetiza, em laboratório, a replicação natural do DNA, graças a uma DNA polimerase (Taq polimerase) isolada de uma bactéria (*Thermus aquaticus*) que vivem em águas termais com temperaturas superiores a 90 °C (BROCK; FREEZE, 1969). Para execução desta técnica, é necessário pelo

menos um par iniciadores (*primers sense e anti-sense*), um fragmento do material genético a amplificar (molde de DNA), nucleotídeos livres (dNTPs), a enzima Taq polimerase, um cofator ($MgCl_2$ ou $MgSO_4$) e uma solução tamponada (MOLINA; TOBO, 2004; POURMOHAMMADI et al., 2010; SILVA et al., 2010a). A solução produzida é então colocada em equipamento chamado de termociclador onde será submetida a três etapas com funções e temperaturas diferentes (1ª etapa - desnaturação, temperatura de 90 a 95°C; 2ª etapa – anelamento, temperatura entre 45 a 60°C e 3ª etapa – extensão, temperatura de 72 °C). O protocolo desta técnica varia de acordo com o tamanho e a constituição do produto que se deseja. Estas etapas podem ser repetidas em até 40 ciclos o que eleva bastante o número de cópias do DNA desejado. O material produzido pode ser observado em corrida de eletroforese, utilizando um gel de agarose ou proliacrilamida corada com brometo de etídio ou *SYBR green* (substância que se intercala no DNA, gerando um produto que emite uma coloração detectável) (PASSOS, 2003; ALCÂNTARA, 2006).

Desde o início da sua utilização para diagnósticos bacterianos na década de 90, a técnica de PCR se tornou uma ferramenta poderosa nos dias atuais para o diagnóstico, identificação da espécie de agentes infecciosos e, também, para avaliação prospectiva de algumas enfermidades. Nas leishmanioses, a análise molecular é uma ferramenta utilizada para elucidar ou auxiliar na solução de problemas da diversidade genética, terapêutica e elaboração de programas de controle. Destes estudos, técnicas como PCR-RFLP (BENSOUSSAN et al., 2006); PCR-SSCP (JACOBSON, et al., 2003); NESTED-PCR (AKHAVAN et al., 2010); Multiplex-PCR (HARRIS et al., 1998), Real Time-qPCR (MARY et al., 2004) foram elaboradas a partir da PCR, apresentando bons resultados com alta sensibilidade, especificidade e repetibilidade (ALCÂNTARA, 2006). Além disso, muitos pesquisadores buscaram novos alvos de DNA com o objetivo de melhorar a capacidade de diferenciar as várias espécies de *Leishmania*, na menor quantidade possível de DNA-alvo da amostra coletada (DENIAU et al., 2003; BHATTARAI et al., 2009; SILVA et al., 2010a). Os principais alvos utilizados são: Minicírculo do cinetoplasto (kDNA), DNA ribossômico (rDNA) e Proteínas do Choque Térmico (HSP).

O DNA do cinetoplasto representa em torno de 25% do DNA do parasito e consiste em uma rede de moléculas circulares, divididas em maxicírculos e minicírculos (TELLERIA et al., 2006). O minicírculo é o alvo mais estudado e aplicado nas pesquisas das leishmanioses. Tem aproximadamente 20.000 unidades, com sequências de 500 a 2500 pb em cada parasito, sendo esta característica a principal vantagem na sua utilização na PCR (SILVA et al., 2010a). A desvantagem na utilização do minicírculo é a considerável heterogeneidade, que induz a

perda de acurácia na técnica, o que já não é observado em outros alvos (MARY et al., 2004). Além disso, a aplicação de enzimas de restrição ao kDNA permite apenas a identificação de grupos ou isolados de mesma área.

O DNA ribossômico (rDNA) é composto de uma região promotora líder, o espaçador transcrito externo (ETS – External Transcribed Spacer), uma região codificadora do rRNA 18S, um espaçador não codificante interno (ITS-1), uma região codificadora de rRNA 5,8S, outro espaçador não codificante interno (ITS- 2), uma região codificadora de rRNA 28S e, finalmente, um segmento intergênico espaçador não transcrito, IGS (MATEUS et al., 2006). Apesar do baixo número de cópias do rDNA (100 a 550), estes alvos são explorados no desenvolvimento para diagnóstico da infecção e identificação das espécies de *Leishmania*. O espaçador interno transcrito (ITS) tem sido utilizado com sucesso e bons resultados na PCR-RFLP para identificação de espécies de *Leishmania* em amostras de sangue (SILVA et al, 2010a), aspirados de medula (ALAM et al., 2009) ou esfregaço de lâminas coradas com Giemsa (KAZEMI-RAD et al., 2008).

Proteínas do choque térmico (Heat Shock Proteins) (HSP) são produtos do estímulo do estresse químico ou térmico. As HSPs são uma classe de proteínas altamente conservadas, agrupadas de acordo com suas sequências de aminoácidos e com seus pesos moleculares (em kD - quilodaltons) em famílias: HSP-27, HSP-47, HSP-60, HSP-70, HSP- 90 e HSP-1103, (MEYER; SILVA, 1999). Dentre estas, a HSP70 se mostrou efetiva, com boa sensibilidade na identificação do gênero de *Leishmania* e dificuldade em identificar as espécies do subgênero *Viannia* (GARCIA et al., 2004). Silva et al., (2010b) através da RFLP conseguiu identificar estas espécies em material oriundo de culturas, demonstrando este alvo como outra ferramenta importante na identificação das leishmanias dermatrópicas causadoras de doenças no ser humano.

Na atualidade as técnicas de reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em especial aquelas que utilizando o DNA ribossomal da *Leishmania* como alvo de detecção tem mostrado resultados promissores, que além de detectar a presença do material genético da *Leishmania*, pode também identificar qual espécie está causando a doença. Desta forma os resultados obtidos nesta técnica poderiam fornecer informações preciosas para elaboração de procedimentos de vigilância mais eficazes na profilaxia, controle e tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar as espécies de *Leishmania* em amostras biológicas de pacientes com LTA avaliados em unidades de saúde e estudo da fauna flebotomínica em áreas de três municípios do estado de Rondônia

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar e caracterizar a fauna flebotomínica existente nas áreas selecionadas no estudo dos municípios Porto Velho, Candeias, Guajará Mirim do estado de Rondônia, identificando os vetores que poderiam ser incriminados na transmissão da LTA;
- Identificar e verificar a distribuição geográfica das espécies de *Leishmania* causadoras de Leishmaniose Humana em pacientes encaminhados a sete unidades de saúde do estado de Rondônia;
- Comparar três sistemas de PCR (kDNA, ITS-1 e HSp70), avaliando qual o melhor método para a detecção e identificação de *Leishmania* em lâminas coradas realizadas no diagnóstico de rotina para LTA, e;
- Avaliar os dados epidemiológicos da população estudada acometida pela leishmaniose, e;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

O estudo foi executado em de três etapas (**FIGURA 12**). Inicialmente, foram realizadas, no período de maio de 2010 a junho de 2012, coletas de material biológico em pacientes com lesões sugestivas de LTA, exames de diagnóstico laboratorial e isolamento da *Leishmania*. Concomitantemente, na segunda etapa, realizou-se um estudo entomológico observacional e descritivo da fauna flebotomínica em áreas delimitadas nos municípios selecionados no Estado de Rondônia, tendo início em agosto de 2010 e estendendo-se a junho de 2012. A terceira e última etapa, teve por objetivo identificar as espécies de *Leishmania* no material biológico obtido. Para isto, foram realizadas, na FIOCRUZ-RJ, no período de fevereiro de 2011 a novembro de 2012, as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase, RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) e sequenciamento gênomico.

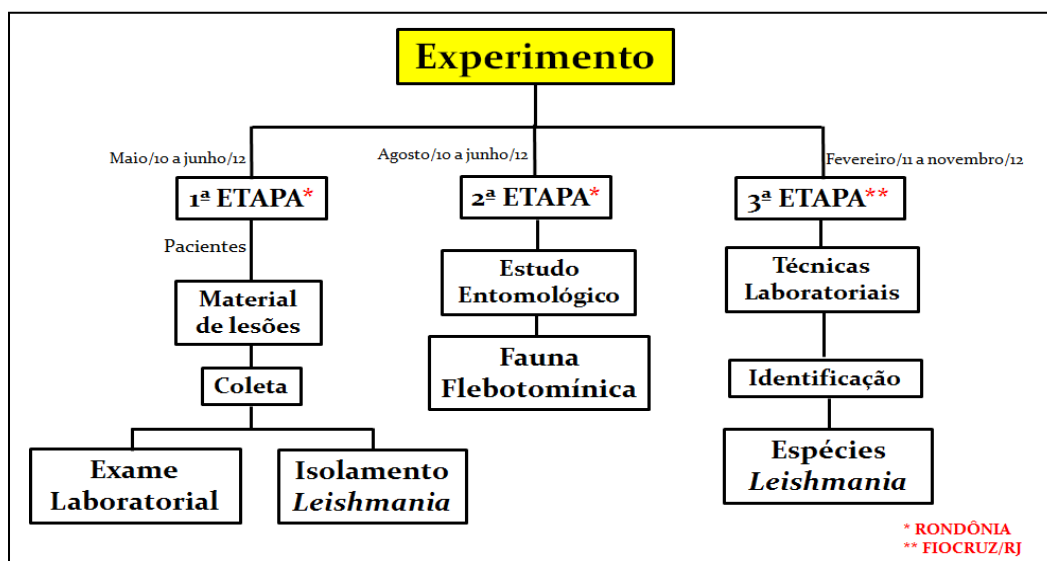


FIGURA 12. Fluxograma das etapas de coleta de material biológico, estudo da fauna flebotomínica e técnicas laboratoriais para identificação das espécies de *Leishmania*

4.2 Coleta de amostras das lesões dos pacientes

Para realização da primeira etapa, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical – CEPETM, o qual recebeu um registro 112/2010 e parecer 10/10 CEP/CEPETM de aprovação em abril de 2010, (ANEXO 1).

As coletas de material biológico (escarificação e punção aspirativa) das lesões de pacientes com LTA foram executadas no Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) e Centro de Pesquisas em Medicina Tropical (CEPEM) do município de **Porto Velho** e Laboratório de Fronteiras (LAFRON) em **Guajará Mirim**. Além destas unidades de saúde, os postos municipais regionais de saúde de **Ariquemes**, **Cacoal**, **Ji-Paraná** e **Vilhena** foram convidados a participar do trabalho, através do envio, ao Laboratório de Controle de Qualidade das Leishmanioses do LACEN (LCQL/LACEN), lâminas coradas com panótico rápido com presença de formas amastigotas de *Leishmania*.

Neste trabalho, foram inclusos pacientes com lesões sugestivas de Leishmaniose Tegumentar Americana, que depois de convidados, foi explicado de forma oral e individual a pesquisa. Posteriormente, foi solicitado, por escrito, o consentimento utilizando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 2), seguido do preenchimento de uma ficha de pacientes antes da coleta (ANEXO 3). Os pacientes selecionados foram aqueles que concordaram e assinaram o TCLE, com idades entre 18 e 70 anos, de ambos os sexos, residentes e com infecção autóctone no Estado, que apresentassem lesões cutâneas, mucosas ou mucocutâneas suspeitas de LTA e um encaminhamento de solicitação médica para realização do exame laboratorial para detecção das leishmanioses. Pacientes com idade menores de 18 anos ou superiores a 70 anos foi solicitado ao responsável o consentimento para participação destes pacientes.

A coleta de material suspeito foi realizada por técnicos de laboratórios, de enfermagem, farmacêuticos ou biomédicos da rede pública de saúde que desempenhavam suas atividades nos postos de coleta anteriormente citados. Quando a suspeita se tratava de lesão cutânea e/ou mucocutânea, as lesões dos pacientes foram submetidas à assepsia com álcool a 70%. Aplicada anestesia local com Lidocaína a 2% sem vasoconstritor. Em seguida, realizada a escarificação em duas porções das bordas das lesões e o produto obtido impresso na lâmina.

Os pacientes positivos no teste em lâmina corada foram submetidos a uma nova coleta de material que foi utilizada ao cultivo e isolamento das *Leishmanias*. Esta coleta seguiu os mesmos cuidados executados para a coleta do escarificado. Após isto, injetou-se, por via intradérmica, 0,1mL solução salina tamponada estéril na borda da lesão, aspirando-a posteriormente para serem depositados em tubos contendo meio de cultura bifásico (NNN + Schneider) e/ou inoculados em camundongos Balb/c.

4.3 Testes de diagnóstico

No estudo um total de 520 pacientes foram avaliados no estudo, destes selecionou-se 240 amostras de pacientes para compor a população amostral do estudo. A **TABELA 1**, demonstra a distribuição destas amostras.

TABELA 1. Quantitativo de amostras por municípios submetidos as técnicas de diagnósticos realizadas durante o desenvolvimento do estudo

MUNICÍPIOS	TÉCNICAS DE LABORATÓRIO					
	N	PDL	PCR	Cultura*	Inoculação*	RFLP** sequenciamento
1. Lâminas do LCQL						
- Ji-Paraná	26	16	16	2	0	10
- Ariquemes	59	38	38	0	0	15
- Vilhena	75	55	55	3	0	13
- Cacoal	31	12	12	0	0	7
Subtotal	190	121	121	5	0	45
2. Pacientes das Unidades de Porto Velho e Guajará Mirim						
- Porto velho	223	79	79	47	20	37
- Guajará Mirim	11	9	9	2	2	2
- Candeias	29	13	13	5	3	6
- Outros municípios	67	18	18	11	5	5
Subtotal	330	119	119	65	30	50
TOTAL	520	240	240	70	30	95

*Técnicas realizadas apenas nas unidades do município de Porto Velho

** Técnica realizada nos laboratórios da FIOCRUZ/RJ

PDL – Parasitológico Direto em Lâmina

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RFLP – enzimas de restrição

4.3.1 Parasitológico Direto em Lâmina (PDL)

A técnica de parasitológico direto em lâmina foi utilizada como teste padrão de diagnóstico no experimento. Esta metodologia consistiu na coleta, impressão e coloração do escarificado da lesão presente na lâmina. Após a coleta, as lâminas foram identificadas e coradas pela técnica de panótico rápido. A coloração consistiu na utilização do kit Panótico Rápido LB (marca Laborclin®) e sua execução seguiu as normas do fabricante. Resumidamente, as lâminas foram submergidas em solução nº 1 (fixador) por 5 segundos, depois retirado o excesso. Posteriormente, foram imersas em solução nº 2 (corante ácido) por mais 5 segundos. Em seguida, foram submersas na solução nº 3 (corante básico) durante 5

segundos. Ao término, retirou-se o excesso dos corantes das lâminas com água destilada. Depois, secas e analisadas em microscopia óptica (aumento 1000X) para observação da presença de formas amastigotas. Consideraram-se como lâminas positivas, aquelas que apresentassem pelo menos uma forma clássica de amastigota (estrutura circular ou ovalada, com núcleo e cinetoplasto arredondado) da *Leishmania* em cem campos visualizados. Após confirmação da positividade, as lâminas foram separadas e armazenadas para uso posterior no experimento.

4.3.2 Caracterização das lâminas positivas no teste parasitológico

As lâminas coradas consideradas positivas encaminhadas pelos postos municipais regionais de saúde ao LCQL/LACEN foram reavaliadas em conjunto com o farmacêutico Wilson Lopes, responsável técnico do LCQL, para confirmação da positividade. Em seguida, todas as lâminas positivas foram submetidas a visualização de 100 campos/lâmina no microscópio óptico (aumento de 1000X) para a contabilização das formas amastigotas. Após contagem, classificaram-se as lâminas em quatro grupos de acordo com o número de amastigotas encontradas na microscopia, conforme descrito abaixo:

GRUPO 1. (SFA) – Não foram observadas formas clássicas de amastigotas de *Leishmania*;

GRUPO 2. (+) – Presença de até 10 amastigotas;

GRUPO 3. (++) – Presença de 11 a 40 amastigotas;

GRUPO 4. (+++) – Presença de mais de 40 amastigotas

Após catalogação, as lâminas foram foto documentadas e armazenadas em temperatura ambiente até submissão da extração e técnicas de PCR.

4.3.3 Cultivo e isolamento dos parasitas

O material colhido das lesões foi inoculado em tubos estéreis contendo meio com uma fase sólida [Novy-MacNeal-Nicolle (NNN)] e outra líquida (meio Schneider acrescidos de 20% de soro fetal bovino, 2% de urina humana, penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL). Após o semeio, os tubos foram cultivados em temperaturas de 28 °C, por até 25 dias, para possível observação de crescimento das formas promastigotas de *Leishmania*. Quando visualizado o crescimento, uma alíquota de 0,1 mL foi retirada e depositada em garrafa de cultivo de 25 cm² contendo meio Schneider acrescidos de 10% de soro fetal bovino, 2% de

urina e antibióticos (penicilina e estreptomicina) para formação de biomassa. Depois de formada, parte deste material foi criopreservada (-80°C) e o restante destinada a extração do material genético para a realização da técnica de PCR para identificação da espécie de *Leishmania* isolada.

4.3.4 Inoculação em camundongos

Para a utilização dos camundongos, o projeto foi previamente submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais do IPEPATRO (CEUA/IPEPATRO), protocolado sob nº 2008/2 folha 2 do livro 1 e avaliado como atendendo aos princípios éticos de experimentação animal em 11 de setembro de 2009, conforme certificado em ANEXO 4.

Camundongos Balb/c foram manualmente contidos e inoculados por via intradérmica no coxim da pata posterior direita com dose única de 50µL de solução salina contendo aspirado/macerado da borda de lesão de pacientes positivos para Leishmaniose Tegumentar Americana. Após inoculação, os animais foram identificados através de cores, distribuídos em grupos de até cinco indivíduos em cada caixa. A observação dos camundongos foi realizada semanalmente durante um período de até 150 dias, para verificar a formação da lesão na pata inoculada. Durante este período, os camundongos foram mantidos no Biotério do IPEPATRO, recebendo água e ração *ad libitum* sob condições ambientais controladas (temperatura e luminosidade). Ao término do período de observação, todos os animais foram previamente sedados utilizando 2mg/kg de peso vivo de quetamina associada com 20mg/kg de peso vivo de xilazina por via intraperitoneal. Após detecção da sedação, realizou-se a eutanásia do animal por meio da inoculação de 0,2 mL de cloreto de potássio por via intra-cardíaca. Posteriormente, foi retirada a pata contendo a lesão, tratada com solução salina contendo antibióticos (penicilina a 200U/mL e estreptomicina 200µg/mL). Em seguida, a pata com a lesão foi manipulada em ambiente estéril (fluxo laminar), onde se realizou a retirada e maceração material da lesão. O produto obtido foi acondicionado em duplicatas em tubos de 1,5 mL, encaminhados ao laboratório de Plataforma Técnica do CEPEM ou Laboratório de Biologia Molecular do LACEN/RO para extração do DNA e congelamento (-20 °C) até a realização da técnica de PCR para a possível identificação da espécie de *Leishmania* isolada.

4.4 Extração e quantificação do DNA genômico

A extração do DNA das *Leishmanias* presentes nas lâminas positivas, no meio NNN e nas lesões das patas inoculadas dos camundongos, foi realizada utilizando o kit Illustra blood genomicPrep mini Spin (marca GE healthcare®) no laboratório de Plataforma Técnica do CEPEN ou Laboratório de Biologia Molecular do LACEN/RO.

Para obtenção do material, toda superfície corada das lâminas foram raspadas e o produto obtido depositado em tubos de 1,5 mL. O raspado foi ressuspendido em 300 µL de água bidestilada estéril, adicionados 20 µL de proteinase K (20mg/mL), 1,5 µL de RNase (2 mg/ml) e 400 µL solução de lise. Seguiu-se com a homogeneização da mistura em aparelho tipo “Vortex” na velocidade máxima por 20 segundos. Após incubação de 15 minutos, em temperatura ambiente, a mistura foi devidamente homogeneizada, transferida a um tubo coluna (item do kit) e centrifugada a 14.000 rpm durante 1 minuto. Descartou-se o sobrenadante obtido, adicionou-se 500 µL solução de lise e repetiu-se a centrifugação de 14.000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi novamente descartado, ao tubo acrescentado 500 µL de tampão de lavagem e nova a centrifugação foi realizada a 14000 rpm por um período de 3 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o tubo coluna transferido para outro tubo de 1,5 mL. Ao tubo coluna foram adicionados 50 µL de eluidor pré-aquecido (70°C) e incubado temperatura ambiente por 1 minuto. Para finalização do processo, outra centrifugação foi executada em velocidade máxima durante 1 minuto. O produto resultante foi transferido a um tubo de 1,5 mL para ser armazenado a -20°C, quantificado o DNA por espectrofotometria no aparelho Thermo scientific, modelo Thermo nanodrop 1000® e, posteriormente, submetidos as técnicas de PCR. Posteriormente, para complementar as análises da PCR-ITS-1, parte do material extraído foi encaminhado ao Laboratório de genética humana da FIOCRUZ – Rondônia aos cuidados da mestrandia Lílian Motta Cantanhede, sob a orientação do Dr Ricardo de Godoi Mattos Ferreira.

4.5 Cepas referência e controles

Para a padronização da PCR, as cepas referência usadas como controle positivo foram *Leishmania (Leishmania) amazonensis* cepa ph8 (IFLA/BR 67/ph8) cedida pelo Dr Francisco Juarez Ramalho-Pinto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/SP e a *Leishmania (Viannia) braziliensis* cepa M2903 (MHOM/BR/1975/M2903) cedida pela Dra. Maria Norma Melo do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. Além disso, materiais extraídos de

indivíduos sem lesão sugestiva de LTA e negativos em pelo menos três testes de diagnóstico para LTA, foram utilizados como referência negativa nas PCRs do estudo. Da mesma forma que os produtos extraídos das amostras de pacientes, as referências positivas e negativas foram quantificadas através de espectrofotometria usando o Thermo scientific, modelo Thermo nanodrop 1000®.

4.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para detecção dos DNAs das leishmanias extraídas das lâminas coradas, culturas e do material da lesão das patas dos camundongos, foram utilizados sistemas PCRs para três diferentes alvos conforme, descrito abaixo.

A primeira técnica, PCR-kDNA, foi realizada no Laboratório de Pesquisas Médicas (LIPMED) da FIOCRUZ/RJ sob a Orientação da Dra Marcia Oliveira. Para este sistema foram utilizados oligonucleotídeos que hibridizam para a origem de replicação de ambas as cadeias da molécula de minicírculo, que é um componente do DNA mitocondrial (kDNA) do parasita, amplificando a região conservada desta molécula. Os *primers* utilizados estão descritos no **QUADRO 3**.

A PCR foi realizada com mix de volume final 25 µl, contendo tampão 10x do fabricante (kit invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 50 ng de cada um dos iniciadores, 1,0 U de Taq DNA polimerase e 2µl da amostra a ser analisada. O DNA foi submetido à amplificação em termociclador (marca Biocycler® e modelo MJ96) sendo a programação constituída de: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos; 30 ciclos, constituídos por desnaturação a 94°C (30 segundos), anelamento a 54°C (30 segundos) e extensão terminal a 72°C (30 segundos). A última etapa realizou-se uma extensão final a 72°C (5 minutos) e para conservação do amplicon, manteve-se o termociclador a uma temperatura de 4°C até retirada do material.

As PCRs com alvos para ITS-1 e HSP70p4, foram executadas no Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose (LPL) do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRZ/RJ sob a Orientação da Dra. Elisa Cupollilo.

No sistema ITS-1, utilizou-se oligonucleotídeos desenhados para o alvo espaçador interno transcrito (ITS) (**QUADRO 3**), que é uma região não codificante encontrada no SSUrRNA, onde o ITS-1 é delimitado pelos genes 18S e 5.8S.. Esta PCR também utilizou um volume final de 25 µl, que continha 2,5 µl contendo tampão 1x do fabricante (kit promega®) 4,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,2 µM de cada um dos *primers*, 1,5 U de Taq DNA

polimerase e 3µL da amostra a ser analisada. O DNA foi submetido à amplificação em um termociclador (marca Biocycler® e modelo MJ96). A programação utilizada foi a seguinte: 94°C por 4 minutos; 35 ciclos, constituídos por desnaturação a 94°C (30 segundos), anelamento a 53°C (30 segundos) e extensão terminal a 72°C (40 segundos). E, finalizando com extensão final a 72°C por 8 minutos.

Para a PCR-HSP70p4, usou-se oligonucleotídeos para as proteínas do choque térmico (do inglês - *Heat Shock Proteins* - HSPs) (**QUADRO 3**). Para a realização desta PCR foram utilizados 2,5 µl de tampão 1x do fabricante (kit promega®) 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 5% de DMSO, 20 pmol de cada um dos *primers*, 1,0 U de Taq DNA polimerase e 3µl da amostra a ser analisada, produzindo um volume final de 25 µl. O DNA foi submetido à amplificação em um termociclador (marca Biocycler® e modelo MJ96). A programação para amplificação do DNA consistiu de: 94°C por 5 minutos; 33 ciclos, constituídos por desnaturação a 94°C durante 30 segundos, anelamento a 61°C por 30 segundos, extensão terminal a 72°C por 40 segundos e um ciclo de extensão final a 72°C por 8 minutos.

QUADRO 3. <i>Primers</i> utilizados para a detecção de leishmanias em amostras de pacientes com LTA avaliadados em sete unidades de saúde do estado de Rondônia			
Sistema PCR	Primers	Tamanho	Referência
kDNA	Sense: HM1(5'-CCGCCCCTATTTTACACCAACCCC-3') Anti-sense: HM2 (5'- GGGGAGGGGGCGTTCTGCGAA-3') HM3 (5'-GGCCCACTATATTAC ACCAACCCC-3')	120 pb	(FRAGA et al., 2010)
ITS-1	Sense: LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') Anti-sense: 5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3')	300-350 bp	(ELTAI et al., 2000)
HSP70p4	Sense: Hsp70sen (5'-GGACGAGATCGAGCGCATGGT- 3') Anti-sense: Hsp70ant (5'-TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG-3')	234 bp	(GRAÇA et al., 2012)

4.7 Teste de identificação das espécies de *Leishmania* (PCR-RFLP e sequenciamento genômico)

Os produtos obtidos das PCRs (PCR-kDNA, PCR-ITS-1 e PCR-HSP70p4) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% em uma tensão de 120V durante 30 minutos. As bandas formadas foram coradas com brometo de etídeo e visualizadas sob luz ultravioleta.

Para a identificação das espécies de *Leishmania*, os produtos positivos do 2º round de PCR-ITS-1, foram submetidas a técnica de PCR-RFLP, utilizando as enzimas de restrição HaeIII e Sau3AI (New England BioLabs) e seis espécies de *Leishmania* como referências [*L. (L) amazonensis*, *L. (L) infantum chagasi*, *L. (V) braziliensis*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V) lainsoni* e *L. (V) naiffi*]. As reações foram realizadas de acordo com as recomendações descritas pelo fabricante. Resumidamente, um volume de 1-8 µl do produto amplificado (dependendo da concentração do DNA medido) foi utilizado em reações com volume final de 10µl. Nesta solução, foi acrescentado 1U de enzima de restrição, 1µl de solução-tampão específica para cada enzima e complementada, quando necessário, com água bidestilada. Posteriormente, os produtos digeridos foram submetidos a eletroforese em géis de poliacrilamida a 12,5% no aparelho Gene Phor Electrophoresis Unit (Pharmacia Biotec®) em uma tensão de 100 V por 1 hora. Após este período, os géis foram corados com prata e o resultado interpretado de acordo com as referências.

Na impossibilidade da identificação das espécies por PCR-RFLP, os fragmentos de 300-350 bp do produto do PCR-ITS-1 e de 234pb do PCR-HSP70p4 observados no gel de agarose a 1,5% foram purificados de acordo com as instruções descritas pelo do fabricante no Wizard SV Gel e PCR Clean-up System kit (Promega®). Os produtos da PCR purificados foram sequenciados utilizando os mesmos iniciadores empregados na reação para a PCR-ITS-1 e PCR-HSP70p4. Posteriormente, o sequenciamento foi conduzido em um sequenciador de DNA automatizado (ABI PRISM1 BigDye™ Terminator Cycle Sequencing) da Plataforma genômica da subunidade de Sequenciamento de DNA - RJ (RPT01A), do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde da FIOCRUZ (PDTIS-FIOCRUZ/RJ).

4.8 Locais de Coleta do inseto vetor

Para realização da primeira etapa do estudo, a coleta de flebotomíneos, foi selecionada pelo menos uma localidade nos municípios de Porto Velho, Candeias do Jamari e Guajará Mirim. A seleção destes municípios deu-se pela facilidade de deslocamento da equipe técnica, estrutura para o desenvolvimento das ações entomológicas e ter apresentado no estudo ao menos um caso de LTA com identificação da espécie de *Leishmania*.

4.8.1 Município de Porto Velho

Para a realização das coletas de flebotomos, no município de Porto Velho, foram selecionadas duas localidades (**FIGURA 13**). A primeira foi denominada de **PVH 1**. Pertencia a um indivíduo com clínica de Leishmaniose cutânea simples. A região estudada situava-se em área rural próximo a uma reserva indígena na zona da mata, distante aproximadamente 70 km da cidade de Porto Velho. Suas coordenadas são: 9°22'08"S; 64°13'58"W, a uma altitude de 115 metros do nível do mar. A área estudada era constituída de uma residência com cinco cômodos, feita de madeira e telada em apenas um dos cômodos. A energia elétrica é a base de um motor alimentado a combustível (gasolina). Atrás da residência, a uns 10 metros, existiam árvores frutíferas (goiabeiras, limoeiro, cupuaqueiro e seriegueleiro). Após a estas fruticulturas, havia uma pequena plantação de mandiocas, que se estendiam até próximo a mata primária amazônica, a qual por sua vez, circundava toda a residência a partir de trinta metros de diâmetro. Nesta localidade, não foram observados a presença de animais domésticos ou de produção.

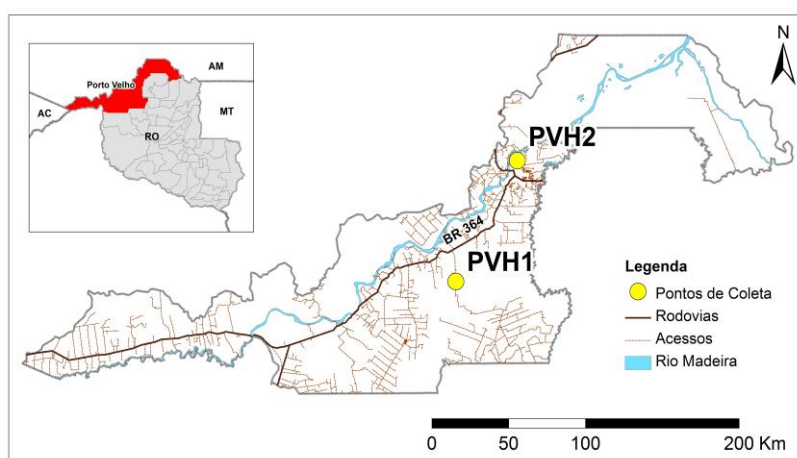


FIGURA 13. Áreas de coletas de flebotomíneos no município de Porto Velho, (PVH1 e PVH2) Rondônia, Brasil, 2011. Adaptado por Fabio Medeiros da Costa e Leando Pieroni em 2013

A segunda localidade foi chamada de **PVH 2**, e correspondia em uma área situada dentro do Parque Natural do Município (Parque Ecológico). O parque localiza-se ao norte da capital, nas coordenadas 8°41'06"S e 63°52'00"W, a cerca de 80 metros acima do mar. A flora predominante era de uma floresta ombrófila aberta, composta de árvores com até 35 metros de altura que favoreciam o acúmulo de matéria orgânica e dificultavam a entrada da luz. Esta área, o “Parque Ecológico” é uma área de lazer, aberta ao público para o desenvolvimento de

atividades de ecoturismo, como caminhadas em trilhas abertas e/ou apenas para contemplação da vegetação ou da fauna.

4.8.2 Município de Guajará-Mirim

No Município de Guajará Mirim foram selecionadas três localidades (**FIGURA 14**). A primeira classificada como **GM 1**, era uma chácara situada em um bairro da periferia da cidade, dentro de mata residual, localizada nas coordenadas 10°45'37"S e 65°17'24"W, a 135 metros de altitude do nível do mar e distante do centro de Guajará Mirim a cerca de 8 km. Nesta chácara, foi detectada a presença de cinco construções. A primeira, situada na entrada da propriedade, servia de moradia da proprietária, era feita de madeira não forrada e com janelas não teladas. A uma distância de 9 metros, havia um “chapéu de palha” que funcionava como cozinha e sala de jantar. Ao lado desta construção, existia um galinheiro de aproximadamente 2 m² feito de madeira. Próximo as três construções, foram observadas pequenas plantações de árvores frutíferas (bananeiras, ingazeiros) que se estendia até o limite da lateral anterior direita propriedade. A quarta estrutura ainda estava em construção e se localizava no meio da propriedade, distante 100 metros da residência habitada. E finalmente, a quinta construção consistia de um pequeno galpão com churrasqueira, localizado ao lado esquerdo da mata residual e á direita de igarapé, distante a quase 160 metros da residência da moradora. O igarapé não é perene, divide a porção final da propriedade, se estendendo as propriedades vizinhas. Em relação à presença de animais foi observada a existência de quatro cães e dez galinhas que ficavam a maior parte do tempo ao redor da residência e “chapéu de palha”.

A segunda localidade (**GM 2**) era uma propriedade rural destinada à atividade agropecuária, com criação de bovinos. Localizada a cerca de 7 km do Distrito IATA do Município de Guajará Mirim com 10°35'18"S e 65°20'08"W como coordenadas, apresentando uma altitude média de 149 metros acima do nível do mar. A propriedade limitava-se com a mata, possuindo uma área de pasteio na porção anterior, central e lateral direito do terreno. Havia também, uma construção abandonada no lado esquerdo bem próximo a mata e outra nos fundos onde residiam aos proprietários. Esta segunda residência apresenta em sua circunvizinhança árvores frutíferas e mais lateralmente um igarapé não perene, tanto na direita e quanto na esquerda.

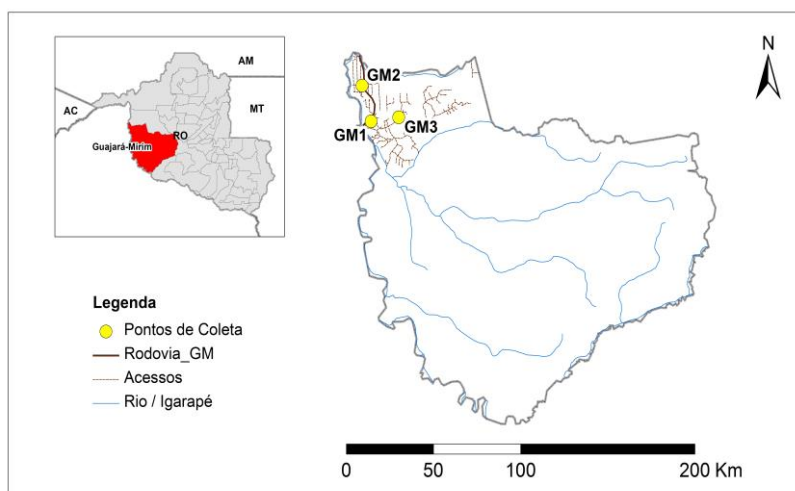


FIGURA 14. Áreas de coletas de flebotomíneos no município de Guajará Mirim (GM1, GM2 e GM3), Rondônia, Brasil, 2011. Adaptado por Fabio Medeiros da Costa e Leandro Pieroni em 2013

A terceira propriedade, denominada de **GM 3**, era uma área rural distante a cerca de 30 km do município de Guajará Mirim. Estava situada próxima a uma reserva ecológica nas coordenadas $10^{\circ}44'30''S$ e $65^{\circ}08'39''W$ a 156 metros acima do nível do mar. A localidade estudada incluía uma área da chácara e circunvizinhanças, adentrando uns 90 metros na mata. Na chácara existiam duas moradias, onde em uma, a primeira da entrada, moravam três pessoas, sendo um indivíduo diagnosticado clínico e laboratorialmente com Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), o seu irmão e mãe. Na outra casa, situada atrás da primeira e no centro da propriedade, residia o “caseiro”. Entre as moradias, a aproximadamente quatro metros atrás da primeira, havia a um galinheiro que habitava ao mesmo tempo dez galinhas e cinco patos. Estes animais, durante o dia, viviam livremente ao redor das casas juntamente com quatro cachorros, um gato, três caprinos e um suíno. O terreno da chácara apresentava um igarapé que percorria a lateral esquerda e parte de trás da propriedade distante das residências em cerca de cinco metros. Lateralmente e pelos fundos, o terreno era limitado pela mata primária, local onde o paciente frequentemente desenvolvia atividades de caça, às vezes permanecendo, durante maior parte da noite, em locais denominados de “esperas” aguardando a caça.

4.8.3 Município de Candeias do Jamari

O terceiro município selecionado para coleta de flebotomíneos foi Candeias do Jamari. Neste a área selecionada, **CJ1**, situava em um bairro chacareiro, com mata residual, na periferia da cidade, próxima a margem esquerda do Rio Candeias, a 3 km de distância do centro da cidade. O ponto central da área selecionada tinha como coordenadas $8^{\circ}46'34''\text{S}$ e $63^{\circ}42'03''\text{W}$, altitude de 78 metros do nível do mar (**FIGURA 15**). Esta localidade apresentou dois casos de LTA, sendo todos pertencentes a mesma família, que de acordo com os dados epidemiológicos, adquiriram a doença na própria área domiciliar. O quintal da residência, aonde aconteceu os casos, limitava-se com um “barranco” (declive acentuado) coberto por vegetação da mata que, por sua vez, terminava nas margens do Rio Candeias. Neste barranco, eram despejados lixos e entulhos, foi observada abundante presença de matéria orgânica e quantidade de insetos.

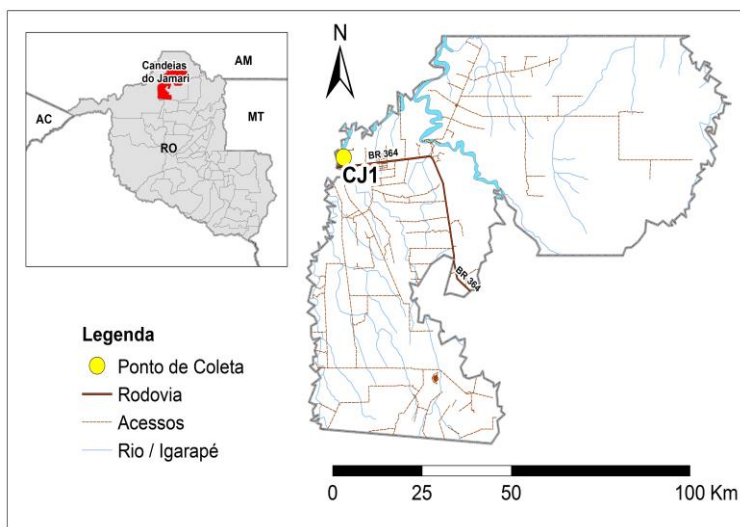


FIGURA 15. Área de flebotomíneos no município de Candeias do Jamari, Rondônia, Brasil, 2011. Adaptado por Fabio Medeiros da Costa e Leando Pieroni em 2013

4.9 Coleta de Vetores

As coletas dos vetores foram realizadas em conjunto com biólogos e técnicos dos setores de entomologia do Núcleo de Entomologia e Biotério do LACEN (NEB/LACEN) e Laboratório de Entomologia do IPEPATRO (LE/IPEPATRO) nos municípios de Porto Velho, Candeias do Jamari, Guajará Mirim independente da estação do ano. As atividades de

capturas de flebotomíneos ocorreram no período de setembro de 2009 a junho de 2012. Para a coleta destes dípteros, foram utilizadas armadilhas luminosas tipo CDC, instaladas suspensas nas árvores a 1,5 e/ou a 6 metros de altura nos horários de 18:00 horas as 6:00 horas. Após este período, as armadilhas com os insetos foram transportadas aos laboratórios de entomologia dos municípios selecionados. Posteriormente, colocadas em freezers -20°C durante 30 min para eutanasiar os insetos. Em seguida, os flebótomos foram separados por sexo, acondicionado em tubos contendo etanol (Merck®) a 70%, transportados ao Laboratório de Entomologia do NEB/LACEN para serem armazenados e submetidos à identificação das espécies. Neste laboratório, os flebotomíneos foram imersos em solução de hidróxido de potássio (Vetek®) a 10% durante 3 horas. Depois, transferidos para solução de ácido acético (Merck®) a 10% por 20 minutos, seguida de três lavagens de 15 minutos cada em água destilada. Os insetos foram imersos por 24h no lactofenol (cedido pela Adriana Zwetsch gestora da qualidade do Laboratório de Referência em Vigilância Entomológica: Taxonomia e Ecologia de Vetores das Leishmanioses da FIOCRUZ/RJ), montados na lâmina de vidro (Perfecta®), adicionado solução Berlese (cedido pela Adriana Zwetsch gestora da qualidade do Laboratório de Referência em Vigilância Entomológica: Taxonomia e Ecologia de Vetores das Leishmanioses da FIOCRUZ/RJ) e posteriormente, colocada lamínula (Perfecta®). Para a identificação dos espécimes capturados, foi utilizada visualização das características morfológicas do díptero seguindo a chave taxonômica proposta por YOUNG; DUNCAN (1994).

5. Análise Estatística

Os dados obtidos no trabalho foram organizados no software Microsoft Excell 2010®, próprio para tabulação. O Software GraphPad Prism 5.0 foi utilizado para a realização da análise descritiva dos dados utilizando porcentagem, média, desvio padrão. Os dados foram submetidos às análises estatísticas para comparações entre alguns parâmetros ou entre as amostras. Devido a natureza categórica das amostras, a comparação destas foi realizada através de tabelas de contingência, utilizando para tanto, o Teste do Qui-Quadrado (χ^2), com nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$) em todas as análises estatística.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização da população do estudo

Neste estudo foram coletadas amostras de lesões em pacientes encaminhados ao CEPEM, LAFRON e LACEN/RO. Além destes, outras quatro unidades de saúde enviaram lâminas coradas com escarificados de lesão para serem analisadas. Ao verificar a origem das amostras, observou-se que as mesmas eram oriundas de 18 municípios diferentes (**FIGURA 16**). A maioria das amostras foram coletadas nas duas unidades de saúde do município de Porto Velho (CEPEM e LACEN/RO). Das 240 amostras estudadas, 79 (32,92%) pertenciam a indivíduos que residiam em áreas do município de Porto Velho, 55 (22,92%) em Vilhena, 38 (15,83%) em Ariquemes e 16 (6,67%) em Ji-Paraná (**FIGURA 17**).

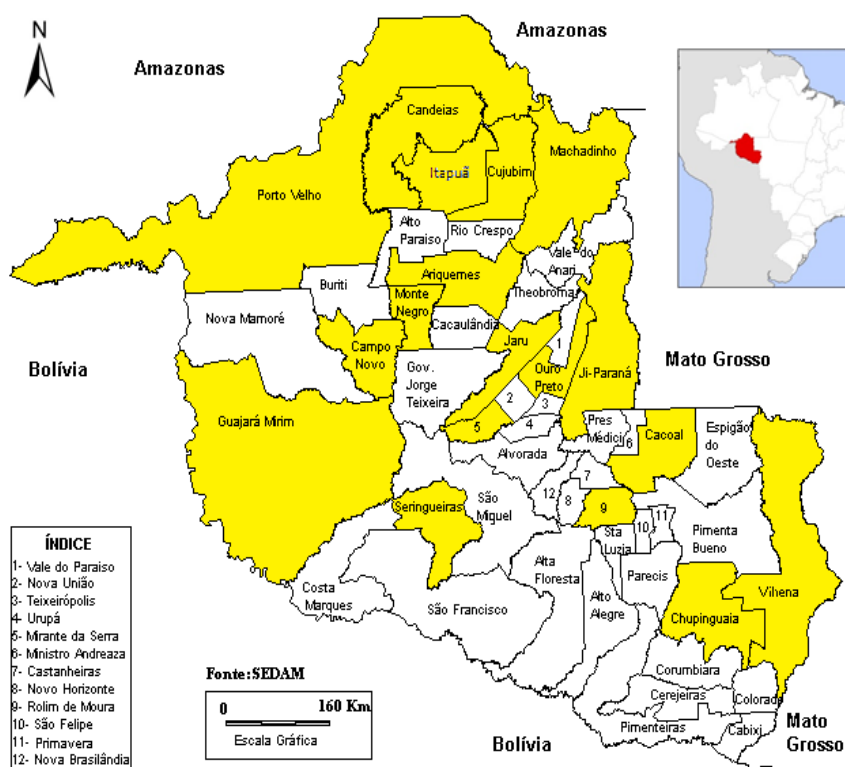


Figura 16. Distribuição das amostras de pacientes de LTA avaliadas no Estado de Rondônia, segundo município de residência.

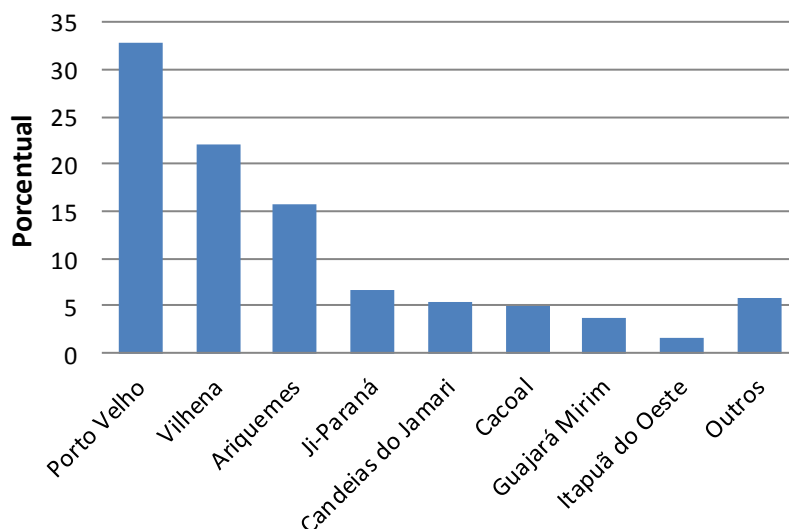


Figura 17. Distribuição das amostras de pacientes de LTA dos pontos de coleta (CEPEM, LACEN/RO e LAFRON), segundo município de residência avaliado no período de maio de 2010 a agosto de 2012.

As amostras, então, foram agrupadas de acordo com sexo e depois subdivididas em seis grupos de acordo com a faixa etária. Contudo, em 10 amostras enviadas ao LCQL do LACEN não foi possível fazer a identificação. O motivo foi a incongruência entre a numeração informada nas lâminas e os dados enviados dos pacientes pelos municípios participantes. Desta forma, estas amostras foram incluídas no estudo tendo como origem o município de envio. Posteriormente, estes materiais foram acrescentados no estudo de caracterização e identificação da espécie de *Leishmania*.

Na análise da distribuição dos casos LTA por sexo, observou-se que o percentual dos homens com a doença (86,96%) foi significativamente superior ($p < 0,0001$) quando comparado com as mulheres (13,04%). A idade média dos pacientes avaliados foi de aproximadamente 34 anos ($33,98 \pm 14,16$ anos). Ao avaliar as amostras separando por sexo, verificou-se que a média de idade no sexo masculino foi próxima aos 35 anos ($34,77 \pm 14,02$ anos), ao passo que no feminino não foi superior a 29 anos ($28,27 \pm 16,86$). Estatisticamente, os valores observados na média de idade entre os sexos não foi significativo. Quando se analisou os grupos por faixa etária, observou-se que o grupo com faixa etária entre 21 a 30 anos, foi o que apresentou maior número de casos com LTA (30,43%). Característica também observada quando realizada a estratificação por sexo, o qual detectou um percentual de 26,52% para os homens e 3,91%, para as mulheres (**TABELA 2**).

TABELA 2. Distribuição de casos segundo sexo e faixa etária

Idade (anos)	SEXO ^a				TOTAL	
	Masculino		Feminino			
	N	%	N	%	N	%
11 – 20	29	12,61	11	4,77	40	17,38
21 – 30	61	26,52	9	3,91	70	30,43
31 – 40	43	18,7	3	1,31	46	20,01
41 – 50	34	14,78	4	1,74	38	16,52
> 50	33	14,35	3	1,31	36	15,66
TOTAL	200	86,96*	30	13,04	230	100
Média ± D.P	34,77 ± 14,02		28,27 ± 16,86		33,98 ± 14,60	

^a amostras de pacientes com LTA encaminhados ao LACEN, LAFRON e CEPEM em maio/2010 a agosto/2012.

* $p < 0,05$

No estudo também foi realizada a avaliação da escolaridade e atividade ocupacional dos pacientes. Observou-se que apenas 15,44% dos pacientes concluíram o ensino médio. Além disso, 59,73% dos avaliados tinham completado no máximo a segunda etapa do ensino fundamental (até o 9º ano, antiga 8ª série). Quando se comparou os sexos, foi identificado que 32,21% dos homens não chegaram a finalizar o ensino fundamental. Ao passo que a maioria das mulheres concluiu ao menos a segunda etapa do ensino fundamental (**TABELA 3**). No tocante a atividade ocupacional, a população estudada desenvolvia, na sua maioria, as atividades não rurais. Dentro deste grupo, a categoria estudantes, em ambos os sexos, foram os mais acometidos (13,33%). Nos casos dos pacientes ruralistas, 25,19% dos homens e 5,19% das mulheres desenvolviam atividades agrícolas. E quando comparado com as categorias identificadas no estudo verificou-se que a classe agricultor era a mais acometida (30,38%) (**TABELA 3**).

TABELA 3. Distribuição de casos de LTA segundo escolaridade e ocupação dos pacientes

Variáveis	Sexo ^a		TOTAL
	Masculino	Feminino	
1. Escolaridade	%	%	%
1.1 - Analfabeto	2,01	0,00	2,01
1.2 - Ensino Fundamental			
- Incompleto			
1ª etapa (1º a 5º ano) incompleta	8,06	2,01	10,07
1ª etapa (1º a 5º ano) completa	2,68	1,34	4,02
2ª etapa (6º a 9º ano) incompleta	32,21	3,36	35,57
- Completo	7,38	0,67	8,05
Subtotal	50,33	7,38	57,71
1.3 - Ensino Médio			
- Incompleto	12,76	4,70	17,46
- Completo	14,09	1,34	15,44
Subtotal	26,85	6,04	32,90
1.4 - Ensino Superior			
- Incompleto	1,34	1,34	2,68
- Completo	2,68	2,01	4,69
Subtotal	4,02	3,35	7,37
TOTAL	83,23*	16,77	100
2. Ocupação	%	%	%
2.1 – Rural			
- Agricultor	25,19	5,19	30,38
- Madeireiro	2,22	-	2,22
- Pecuaria	2,22	-	2,22
- Op. de Maq. Pesado (trator)	5,19	0,0	5,19
Subtotal	34,82	5,19	40,01
2.2 – Não Rural			
- Estudante	8,89	4,44	13,33
- Funcionário Público	5,93	0,0	5,93
- Militar	2,22	1,48	3,7
- Do lar	0,00	3,70	3,7
- Pedreiro	3,70	0,0	3,7
- Comerciante	2,96	-	2,96
- Motorista	2,22	-	2,22
- Eletricista	2,22	-	2,22
- Desempregado	2,22	-	2,22
- Outros	9,63	1,48	11,11
Subtotal	39,99	11,10	51,09
- Não informado	6,67	2,22	8,89
TOTAL	81,48	18,52	100,00

^a amostras de Pacientes com LTA encaminhados ao LACEN, LAFRON e CEPEN encaminhadas em maio/2010 a agosto/2012.

* p<0,05

A maioria dos pacientes apresentou a leishmaniose na forma cutânea (98,26%), apenas 2,61% indivíduos apresentaram clínica mucosa ou mucocutânea da enfermidade e foi observado um único e raro caso de Leishmaniose Cutânea Difusa (0,44%). Ao analisar localização das lesões, observou-se que estas predominavam nos membros (73%), sobretudo nos membros inferiores (40%) (**FIGURA 18**). Nos indivíduos do sexo masculino, as lesões estavam presentes, em sua maioria, nos membros do lado direito do corpo (38,80% dos casos). Ao passo que, nas mulheres, as lesões incidiram nos membros do lado esquerdo (6,56% dos casos) (**FIGURA 19**).

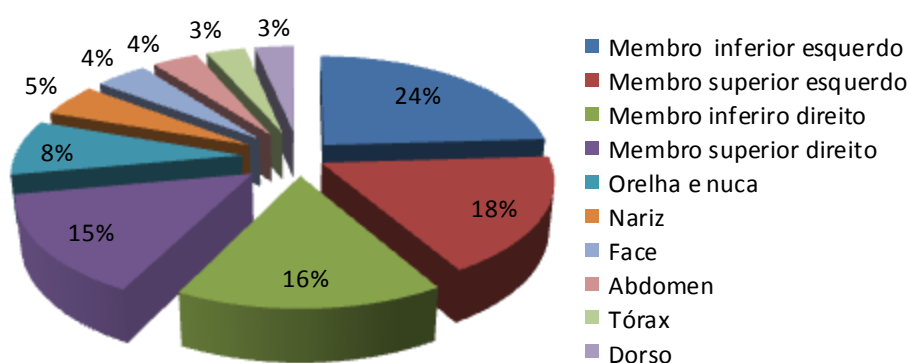


FIGURA 18. Distribuição das lesões nos pacientes estudados no período maio de 2010 a agosto de 2012.

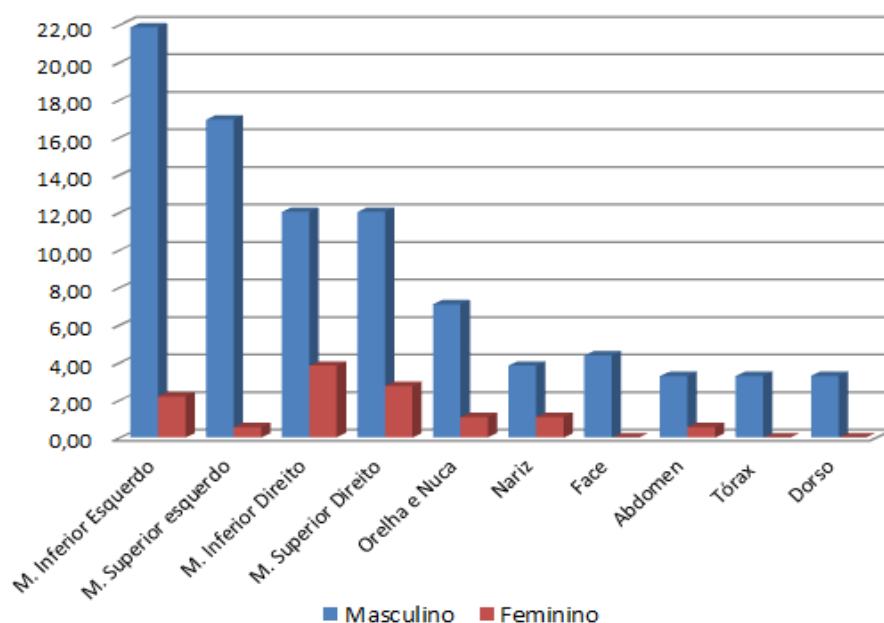


FIGURA 19. Localização das lesões segundo o sexo dos pacientes estudados no período maio de 2010 a agosto de 2012.

6.2 Testes de diagnósticos

Neste trabalho, foram encaminhados aos pontos de coletas do LACEM, CEPEM e LAFRON, 330 pacientes com lesões sugestivas de LTA. Entretanto, apenas indivíduos que apresentaram resultados positivos no exame parasitológico direto, no meio de cultura bifásica (NNN + Schneider) e/ou em inoculação em camundongo foram incluídos na pesquisa. Adicionalmente, o Laboratório de Controle de Qualidade das Leishmanioses do LACEN (LCQL) recebeu 190 lâminas coradas consideradas positivas dos Postos Regionais de Saúde de Ariquemes, Ji-Paraná, Cacoal e Vilhena. Desta forma, foram inclusas no estudo aquelas confirmadas com presença de formas clássica de amastigotas e/ou formas sugestivas (ausência de umas das estruturas da amastigota) de *Leishmania* por um dos reavaliadores.

Para o estudo, foram selecionadas 240 lâminas, sendo 217 com presença de formas clássicas de amastigotas, quinze com formas sugestivas de amastigotas na reavaliação e oito foram negativas no parasitológico direto, mas positivas na inoculação em camundongo, na cultura em meio NNN e/ou tinham histórico de LTA com positividade no teste de Intradermorreação de Montenegro. Estas amostras, além de terem sido submetidas ao exame parasitológico direto em lâminas, também foram utilizadas nos ensaios de PCR.

Das amostras colhidas nas três unidades de saúde (LACEN, CEPEM e LAFRON), 70 foram submetidas ao meio de cultura bifásico (NNN + Schneider), o qual apresentou, no estudo, uma positividade de 28,57% (**TABELA 4**). Nesta técnica, o percentual de contaminação fúngica e/ou bacteriana foi idêntico ao encontrado nas culturas positivas (28,57%). Apesar desta metodologia ter sido realizada, restritamente, nas unidades de coleta de Porto Velho e Guajará Mirim, foi possível semear, no meio bifásico, amostras de treze municípios do Estado, destes conseguiu-se isolar *Leishmanias* em amostras de cinco cidades.

TABELA 4. Exames realizados nas amostras de pacientes encaminhados ao LACEN, LAFRON e CEPEM, no período de Maio de 2010 a Agosto de 2012, Rondônia, Brasil.

Exame	Positivo		Negativo		Divergente		Total
	N	%	N	%	N	%	
Parasitológico direto	217	90,42*	23	9,58	-	-	240
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)#	180#	75,00*	60	25,00	-	-	240
Cultura em meio NNN	20	28,57*	50	71,43	-	-	70
Inoculação em Camundongo Balb/c	3	10,00*	27	90,00	-	-	30
Parasitológico direto + PCR	160	66,67	3	1,25	77	32,08	240
Parasitológico + NNN	15	21,42	3	4,29	52	74,29	70
Parasitológico + Inoculação	1	3,33	1	3,33	28	93,34	30

Amostras positivas em pelo menos em um dos três sistemas de PCR. Símbolos iguais diferenças significativas. * p<0,05

No tocante a inoculação em camundongos da linhagem Balb/c, o ensaio foi realizado somente no município de Porto Velho e com 30 amostras. O índice de positividade da técnica foi de 10%, a menor dentre as metodologias realizadas no experimento (**TABELA 4**). Além disso, as amostras que induziram a formação de lesões nas patas dos animais pertenciam a pacientes dos municípios de Porto Velho (duas amostras) e Guajará Mirim (uma amostra) (**TABELA 5**).

TABELA 5. Comparação dos resultados do parasitológico direto, PCR-kDNA, cultura e Inoculação segundo município de residência dos pacientes encaminhados ao LACEN, LAFRON e CEPEM, no período de Maio/2010 a Agosto/2012, Rondônia, Brasil.

MUNICÍPIOS	TESTES DE DIAGNÓSTICO							
	Parasitológico direto		PCR-kDNA		Cultura		Inoculação em camundongos	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Porto Velho	66 (83,5%)	13 (16,5%)	61 (77,2%)	18 (23,8%)	15 (31,9%)	32 (68,1%)	2 (10%)	18 (90%)
Vilhena	54 (98,2%)	1 (1,8%)	35 (63,6%)	20 (36,4%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)	-	-
Cacoal	12 (100%)	0 (0%)	5 (41,8%)	7 (58,2%)	-	-	-	-
Ariquemes	35 (92,1%)	3 (7,9%)	21 (55,3%)	17 (54,7%)	-	-	-	-
Guajará Mirim	8 (88,9%)	1 (11,1%)	6 (66,7%)	3 (33,3%)	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)
Candeias do Jamari	12 (92,3%)	1 (7,7%)	8 (61,5%)	5 (38,5%)	0 (0%)	5 (100%)	0 (0%)	3 (100%)
Ji-Paraná	13 (81,3%)	3 (18,7%)	14 (87,5%)	2 (12,5%)	1 (50%)	1 (50%)	-	-
Itapuã	4 (100%)	0 (0%)	3 (75%)	1 (25%)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	2 (100%)
Outros	11 (78,6%)	3 (21,4%)	7 (50%)	7 (50%)	1 (12,5%)	7 (87,5%)	0 (0%)	3 (100%)
TOTAL	240		240		70		30	

6.3 Avaliação das amostras extraída das lâminas submetidas a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para os ensaios da PCR, todas as 240 amostras foram submetidas aos sistemas PCR-kDNA, PCR-ITS1 e PCR-HSP70p4. Para a computação dos resultados, as amostras foram consideradas positivas quando estas produzissem, pelo menos, um amplicon com tamanho correspondente ao controle de referência positiva [amplicons de *Leishmania (V) braziliensis*] nos sistemas utilizados no estudo (**FIGURA 20**). Portanto, o fragmento desejado na PCR-kDNA, deveria apresentar um tamanho de 120 pb (**FIGURA 20A**). Para a PCR-ITS-1, o fragmento de banda seria de 300-350 pb (**FIGURA 20B**). Ao passo, que na PCR-HSP70p4, as amostras positivas teriam que ter uma banda correspondente a 234 pb (**FIGURA 20C**).

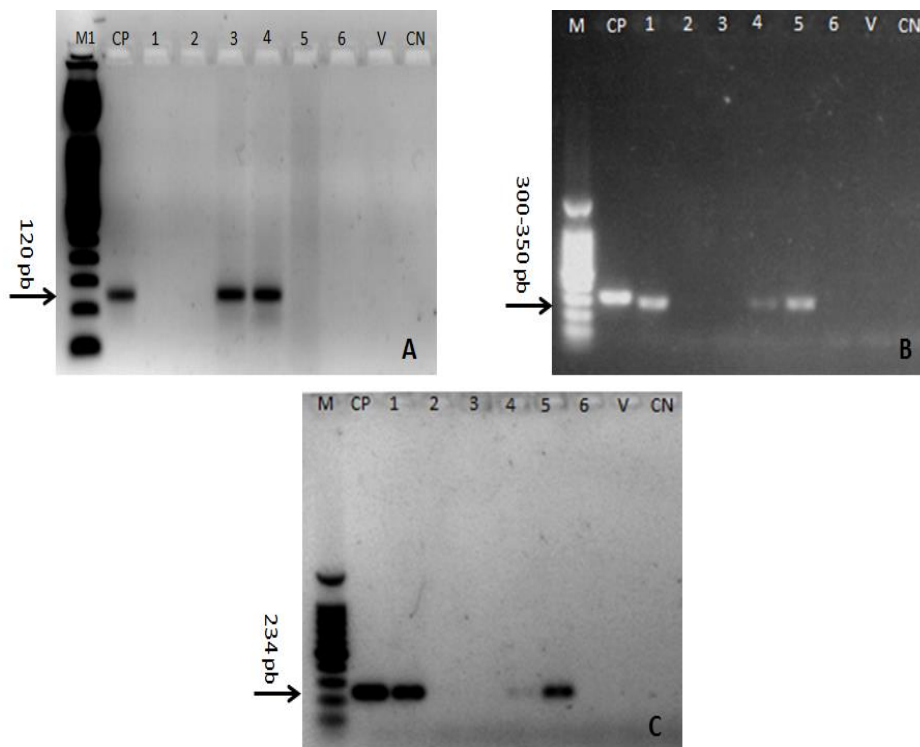


FIGURA 20 - Gel de eletroforese representativo demonstrando a amplificação dos sistemas de PCRs. **Painel A** – fragmentos de 120 pb amplificados na PCR-kDNA usando os *primers* HM1, HM2 e HM3. **Painel B** – fragmentos de 300-350 pb amplificados na PCR-ITS-1 usando os *primers* LITR e 5.8S. **Painel C** – fragmentos de 234 pb amplificados na PCR-HSP70-p4 usando os *primers* Hsp70sen e Hsp70ant. (M1) – marcador molecular de 50 pb, (M) – marcador molecular de 100 pb; CP – controle positivo (DNA de *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903); CN - controle negativo (mistura da reação); 1-6 material obtido de lâminas de pacientes com LTA; V – poço vazio.

Ao avaliar os resultados das PCRs, observou-se que, das 240 amostras, 180 produziram, em pelo menos uma das PCRs, amplicons com tamanhos correspondentes ao controle de referência positiva. O sistema PCR-kDNA, foi capaz de detectar DNA de *Leishmania* em 66,26% das amostras avaliadas, ao passo que as outras PCRs detectaram apenas 28,75% (PCR-ITS1) e 25,83% (PCR-HSP70p4) de amostras positivas (**TABELA 6**). Ao avaliar o resultados das PCRs em relação a quantidade de amastigotas presentes na lâmina verificou-se que o grupo (+++), foi o que mais detectou DNA do protozoário nos sistemas da PCR-kDNA (83,88% das amostras) e HSP70p4 (40,30% das amostras). Quando observou-se o sistema que utilizou os iniciadores para detecção do DNA ribossomal (ITS-1), o grupo (+++) foi apenas o segundo, atrás do grupo SFA (41,67%), detectando DNA da *Leishmania* em 40,30% das

amostras. Adicionalmente, foi observado, um número elevado de amostras positivas no grupo onde não foram visualizados formas clássicas de amastigotas (SFA) na PCR-ITS-1 e, sobretudo na PCR-kDNA (79,17%).

Quando se compararam estatisticamente os resultados entre os três sistemas de PCR, observou-se que os valores obtidos na PCR-kDNA foram significativamente superiores quando comparado aos detectados na PCR-ITS-1 e PCR-HSP70p4 ($p < 0,0001$). Entretanto, ao comparar os resultados conseguidos da PCR-ITS1 com os obtidos da PCR-HSP70p4, as diferenças não foram significativas ($p = 0,4732$) (TABELA 6).

TABELA 6. Resultados das PCRs utilizando *primers* para kDNA, ITS-1 e HSP70, segundo quantidades de amastigotas visualizadas nas lâminas do parasitológico direto de amostras de pacientes encaminhados ao LACEN, LAFRON e CEPEM, no período de Maio/2010 a Agosto/2012, Rondônia, Brasil.

Grupos	N	PCR					
		kDNA		ITS-1		HSP70	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
+++	67	56 (23,34%)	11 (4,58%)	27 (11,25%)	40 (16,67%)	27 (11,25%)	40 (16,67%)
++	51	28 (11,66%)	23 (9,58%)	8 (3,33%)	43 (17,92%)	9 (3,75%)	42 (17,5%)
+	98	56 (23,34%)	42 (17,5%)	24 (10%)	74 (30,83%)	21 (8,75%)	77 (32,08%)
SFA	24	19 (7,92%)	5 (2,08%)	10 (4,17%)	14 (5,83%)	5 (2,08%)	19 (7,92%)
Subtotal	240	159 (66,26%)*	81 (33,74%)	69 (28,75%)*	171 (71,25%)	62 (25,83%)*	178 (74,17%)
TOTAL		240		240		240	

SFA –sem visualização de formas clássicas de amastigotas/100 campo/lâmina;

(+) – visualização de até 10 amastigotas/100 campos/lâmina;

(++) – visualização de 11 até 40 amastigotas/100 campos/lâmina

(+++)- mais de 41 amastigotas/100 campos/lâmina

* símbolos iguais estatisticamente diferentes, para $p < 0,05$,

6.4 Comparação da Sensibilidade da PCR com os outros métodos de diagnóstico

O teste padrão do experimento foi o parasitológico direto em lâmina. No estudo, tentou-se utilizar a técnica de PCR para identificar a presença de material genético da *Leishmania* através de iniciadores destinados ao DNA do cinetoplasto (kDNA), DNA ribossomal (ITS-1) ou aos genes das proteínas de choque térmico (HSP70p4). Ao avaliar o percentual de amostras positivas em pelo menos em um dos sistemas de PCR, observou-se que estas foram capazes de identificar em 75% (180 amostras) a presença de DNA leishmanial. Estatisticamente, este percentual foi significativamente menor do que encontrado no teste

parasitológico direto (90,42%) ($p = 0,0002$) e significativamente superior ($p < 0,0001$), aos resultados observados no meio de cultura bifásica (28,57%) e inoculação em camundongo (10%) (**TABELA 4**).

No estudo observou-se que a similaridade (amostras que foram positivas e negativas ao mesmo tempo em ambos os testes) dos resultados entre a PCR e o parasitológico direto estava em torno de 68%. Este percentual foi muito inferior quando se comparou as PCRs com as técnicas de meio de cultura bifásica e inoculação em camundongo, tendo, respectivamente, 18 (25,71%) e 2 (6,66%) amostras com resultados idênticos em ambos os testes. Por outro lado, ao comparar somente resultados de amostras positivas da PCR com entre estas mesmas técnicas a similaridade foi elevada para 100%. No parasitológico direto, o percentual de amostras que também foram positivas na PCR ficou próximo a 74%.

A PCR-kDNA, foi a segunda metodologia que mais detectou a presença de *Leishmania* nas amostras avaliadas. Ela foi capaz de identificar DNA do protozoário em 159/240 amostras. Além disso, ao correlacionar os resultados desta técnica com os municípios aonde residiam os pacientes, verificou-se que o maior percentual de positividade ocorreu em amostras oriundas de Ji-Paraná (87,5%). O segundo maior índice foi de Porto Velho (77,2%), seguidos de Itapua (75%) e Guajará Mirim (66,7%) (**TABELA 5**).

6.5 Identificação das espécies de *Leishmania*

No estudo foram realizadas seis técnicas de diagnósticos para detecção do agente causador da LTA, no entanto, nenhuma delas foi capaz de distinguir as espécies. Para alcançar este objetivo, foram realizadas, a PCR-RFLP e o sequenciamento genético dos amplicons produzidos das PCR-kDNA, ITS-1 e HSP70-p4. Nos ensaios, das 95 amostras analisadas, em 70 foi possível identificar a espécie de *Leishmania* que estavam distribuídas em onze municípios do Estado. A maior parte das leishmanias caracterizadas ocorreu na cidade de Porto Velho (41,4% das amostras) e, secundariamente, nos municípios de Ariquemes (12,9% das amostras) e Vilhena (12,9% das amostras).

Das sete espécies de *Leishmania* incriminadas como agente causador da LTA em humanos no Brasil, cinco delas foram caracterizadas no estudo. Destas, quatro pertenciam ao subgênero Viannia [*L. (V) braziliensis*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V) lainsoni* e *L. (V) naiffi*] e uma ao subgênero Leishmania [*L. (L) amazonensis*]. A *L. (V) braziliensis* foi identificada em 34 (48,6%) amostras. Já a *L. (L) amazonensis*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V) lainsoni* e *L. (V) naiffi*

(1,4%) foram caracterizadas, respectivamente, em 9,9%, 5,8%, 1,4% e 1,4% do material submetido a identificação.

No tocante a distribuição das espécies do protozoário identificado nas amostras, no território estadual, a *L. (V) braziliensis* foi caracterizada nos municípios de Porto Velho (18,6%), Cacoal (8,6%), Vilhena (8,6%), Ariquemes (5,7%), Ji-Paraná (2,9%), Itapuã D'Oeste (1,4%), Mirante de Serra (1,4%) e Seringueiras (1,4%) (**FIGURA 21** e **TABELA 7**). A *L. (L) amazonensis*, segunda espécie mais caracterizada na pesquisa, foi encontrada em amostras oriundas de Porto Velho (7,1%), Guajará Mirim (1,4%) e Vilhena (1,4%). Já a *L. (Viannia) guyanensis* foi detectada somente em dois municípios (Porto Velho e Candeias do Jamari). A *L. (Viannia) naiffi* foi identificada em amostra em uma paciente da cidade de Ariquemes. E, o único isolado de *L. (V) lainsoni* no estudo ocorreu em um indivíduo residente na área do município de Porto Velho. Na PCR-RFLP, 23 amostras (33,34%) não foi possível diferenciar os perfis de *L. (Viannia) braziliensis* com o dos perfis da *L. (Viannia) guyanensis*. Somado a isto, a pouca quantidade de material extraído e produto da PCR destas amostras impossibilitou o reteste da RFLP ou mesmo realizar o sequenciamento genômico.

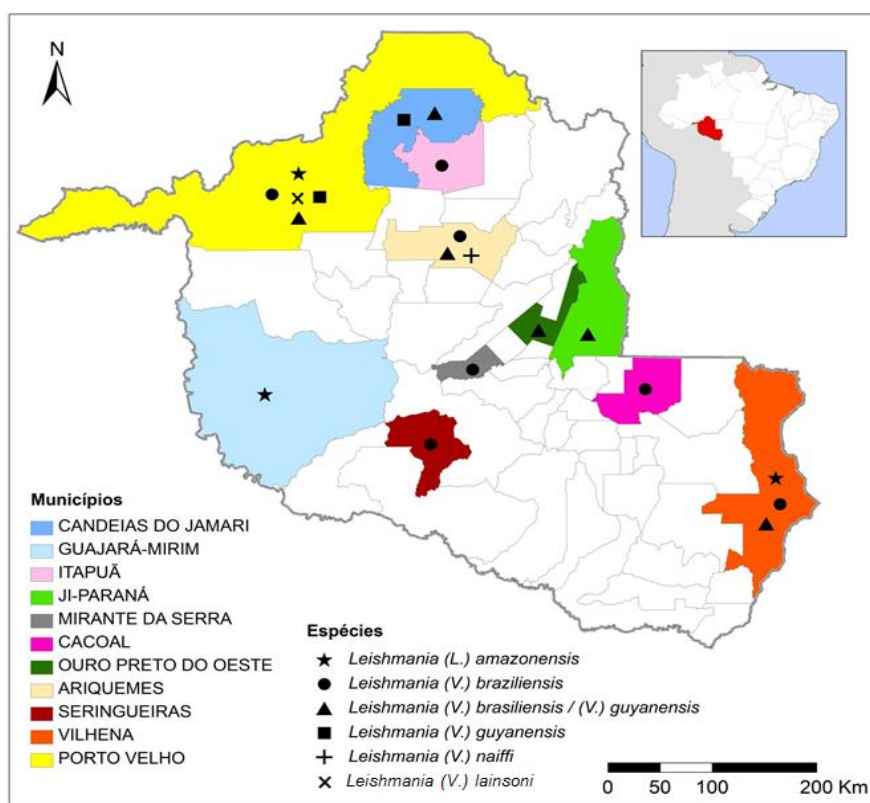


FIGURA 21. Distribuição das espécies identificadas por RFLP da PCR-ITS-1 e/ou sequenciamento do material obtido por PCR-ITS-1 e PCR-HSP70p4, segundo município de residência dos pacientes estudados no período maio de 2010 a agosto de 2012. Adaptado por Fabio Medeiros da Costa e Leandro Pieroni em 2013

TABELA 7. Distribuição das espécies de *Leishmania* identificadas por RFLP da PCR-ITS-1 e/ou sequenciamento do material obtido por PCR-ITS-1 e PCR-HSP70p4, segundo município de residência de pacientes encaminhados ao LACEN, LAFRON e CEPEM, no período de Maio de 2010 a Agosto de 2012, Rondônia, Brasil.

MUNICÍPIO	ESPÉCIE						TOTAL
	<i>L. (V) braziliensis</i>	<i>L. (L) amazonensis</i>	<i>L. (V) guyanensis</i>	<i>L. (V) braziliensis/ L. (V) guyanensis</i>	<i>L. (V) naiffi</i>	<i>L. (V) lainsoni</i>	
Porto Velho	13 (18,6%)	5 (7,1%)	2(2,9%)	8 (11,4%)	-	1 (1,4%)	29 (41,4%)
Cacoal	6 (8,6%)	-	-	-	-	-	6 (8,6%)
Ji-Paraná	2 (2,9%)	-	-	4 (5,7%)	-	-	6 (8,6%)
Guajará Mirim	-	1 (1,4%)	-	-	-	-	1 (1,4%)
Itapuã	1 (1,4%)	-	-	-	-	-	1 (1,4%)
Candeias do Jamari	-	-	2 (2,9%)	4 (5,7%)	-	-	6 (8,6%)
Vilhena	6 (8,6%)	1 (1,4%)	-	2 (2,9%)	-	-	9 (12,9%)
Ariquemes	4 (5,7%)	-	-	4 (5,7%)	1 (1,4%)	-	9 (12,9%)
Mirante da Serra	1 (1,4%)	-	-	-	-	-	1 (1,4%)
Seringueiras	1 (1,4%)	-	-	-	-	-	1 (1,4%)
Ouro Preto	-	-	-	1(1,4%)	-	-	1 (1,4%)
TOTAL	34 (48,6%)	7 (9,9%)	4 (5,8%)	23 (32,8%)	1 (1,4%)	1 (1,4%)	70 (100%)

No trabalho, quando se classificou as amostras por sexo, verificou-se que 90% espécies identificadas pertenciam a pacientes do sexo masculino e apenas 10% eram oriundas de indivíduos do sexo feminino. Adicionalmente, nas 70 amostras, foi avaliado o tempo de evolução das lesões em relação á espécie isolada. Neste estudo, constatou-se que as lesões com maior tempo de evolução, tinham em suas amostras a *L. (V) braziliensis*. Nestas lesões, o tempo médio de evolução foi de $6,97 \pm 12,07$ meses, sendo o mínimo de 15 dias e máximo de até 36 meses de evolução. Diferentemente, em pacientes acometidos por outras espécies o tempo médio não foi superior a 4 meses, e o maior tempo de evolução observado foi em um paciente acometido por *L. (V) guyanensis* que apresentou uma lesão única com 8 meses.

Um dos pacientes, com histórico clínico de lesões nodulares e confluentes, com negatividade da IDRM e positividade no parasitológico direto, teve a identificação da espécie *L. (L) amazonensis* por RFLP dos produtos das PCR-ITS-1 e PCR-HSP70p4, e a confirmação por análise eletroforetica de isoenzimas (MLEE) e por sequenciamento genômico. Este paciente apresentava uma forma rara da Leishmaniose, denominada de Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), sendo este o primeiro caso desta enfermidade no estado de Rondônia com a descrição clínica e laboratorial (Aprigio et al., 2013 – artigo submetido. ANEXO 5).

6.6 Identificação das espécies de flebotomíneos

Para a identificação das espécies de flebotomíneos, as capturas foram realizadas em localidades de três municípios (Porto Velho, Candeias e Guajará Mirim). As atividades foram executadas no período de setembro/2009 a dezembro/2011 e resultaram em um total de 1863 flebótomos capturados.

No município de Porto Velho, as coletas foram realizadas durante os meses de janeiro a setembro de 2011 utilizando um total de 54 armadilhas distribuídas em onze coletas. Esta atividade permitiu identificar 20 espécies diferentes, sendo que destas, apenas seis (*Lu. antunesi*, *Lu. amazonensis*, *Lu. chagasi*, *Lu. davis*, *Lu. ubiquitalis* e *Lu. inflata*) foram encontradas compondo as faunas entomológicas de **PVH1** e **PVH2** (TABELA 8). Avaliando os espécimes capturados na localidade **PVH1**, verificou-se que os flebótomos *Lu. amazonensis*, *Lu. chagasi* e *Lu. ubiquitalis* foram as espécies encontradas em maior número. Ao passo que em **PVH2**, *Lu. antunesi*, *Lu. sordelli* e *Lu. amazonensis* foram dípteros de maior representatividade na fauna. Além disso, ao analisar a fauna entomológica capturada em Porto Velho correlacionando-os com aos vetores de importância na transmissão da LTA em humanos, observou-se que 7/20 das espécies identificadas (*Lu. antunesi*, *Lu. chagasi*, *Lu. davis*, *Lu. ubiquitalis*, *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. migonei*) já foram associadas ou incriminadas na transmissão dessa enfermidade. Outro dado importante, é que estes dípteros somados representam mais da metade das espécies capturadas (58,96%) no município, sendo todas encontradas na localidade de **PVH1** e somente três (*Lu. antunesi*, *Lu. davis* e *Lu. ubiquitalis*) em **PVH2** (FIGURA 22).

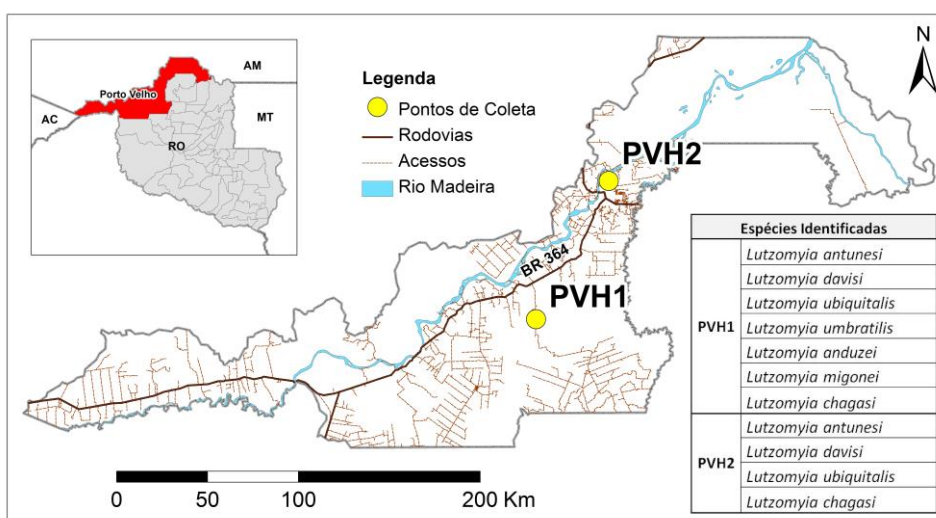


FIGURA 22. Distribuição dos potenciais vetores da LTA nos município de Porto Velho, no período de janeiro a setembro de 2011. Adaptado por Fabio Medeiros da Costa e Leandro Pieroni em 2013

TABELA 8. Espécies de flebotomíneos coletados nas duas localidades do município de Porto Velho, Rondônia, Brasil, no período de janeiro a setembro de 2011.

ESPÉCIE	LOCALIDADE				TOTAL
	PVH1		PVH2		
	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	
<i>Lutzomyia antunesi</i>	1	0	36	46	83
<i>Lutzomyia sordelli</i>	-	-	18	1	19
<i>Lutzomyia amazonensis</i>	5	3	3	5	16
<i>Lutzomyia chagasi</i>	4	4	1	2	11
<i>Lutzomyia davisi</i>	6	0	2	2	10
<i>Lutzomyia ubiquitalis</i>	1	6	1	1	9
<i>Lutzomyia inflata</i>	0	5	2	0	7
<i>Lutzomyia octavioi</i>	0	6	-	-	6
<i>Lutzomyia umbratilis</i>	6	0	-	-	6
<i>Lutzomyia begonae</i>	-	-	3	1	4
<i>Lutzomyia anduzei</i>	0	3	-	-	3
<i>Lutzomyia migonei</i>	0	3	-	-	3
<i>Lutzomyia caligata</i>	-	-	0	2	2
<i>Lutzomyia corossoniensis</i>	2	0	-	-	2
<i>Lutzomyia saulensis</i>	0	2	-	-	2
<i>Lutzomyia campbelli</i>	-	-	0	1	1
<i>Lutzomyia falcata</i>	-	-	1	0	1
<i>Lutzomyia hirsuta nicaraguensis</i>	0	1	-	-	1
<i>Lutzomyia rondoniensis</i>	0	1	-	-	1
<i>Lutzomyia sherlocki</i>	-	-	0	1	1
Subtotal	25	34	67	62	188
<i>Lutzomyia sp</i>	3	0	2	0	5
MII	8	0	10	1	19
TOTAL	36	34	79	63	212

MII – material impróprio para identificação

Em Guajará Mirim, as atividades foram realizadas durante 14 meses, iniciando em agosto/2010 a dezembro/2011. Durante este período, foram realizadas 24 capturas (6 em **GM1**, 8 em **GM2** e 10 em **GM3**), totalizando 107 armadilhas instaladas e 1657 flebótomos capturados. No processo de identificação, 1507 dípteros conseguiu-se identificar até o nível de espécies, 67 chegou-se apenas a gênero e em 83 não foi possível realizar a caracterização por ausência de estruturas morfológicas no flebótomo essenciais à chave de identificação taxonômica. Ao analisar a fauna flebotomínica coletada neste município, observou-se uma grande diversidade de flebótomos capturados, com total de 55 espécies caracterizadas. Dentre estas, verificou-se que quatorze (*Lu. antunesi*, *Lu. ubiquitalis*, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. davisi*, *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei*, *Lu. gomezi*, *Lu. migonei*, *Lutzomyia ayrozai* e em raro encontro: *Lu. paraensis*, *Lu. whitmani*, *Lu. fischeri* e *Lu. intermedia*) eram espécimes descritas, na literatura, como potenciais transmissores de LTA em humanos (**FIGURA 23**), que juntas

representavam 73% (1211 espécimes) da fauna flebotomínica capturada. Além disso, observou-se que a espécie predominante, *Lu. antunesi*, sozinha representava aproximadamente 67,% dos flebótomos identificados (**TABELA 9**).

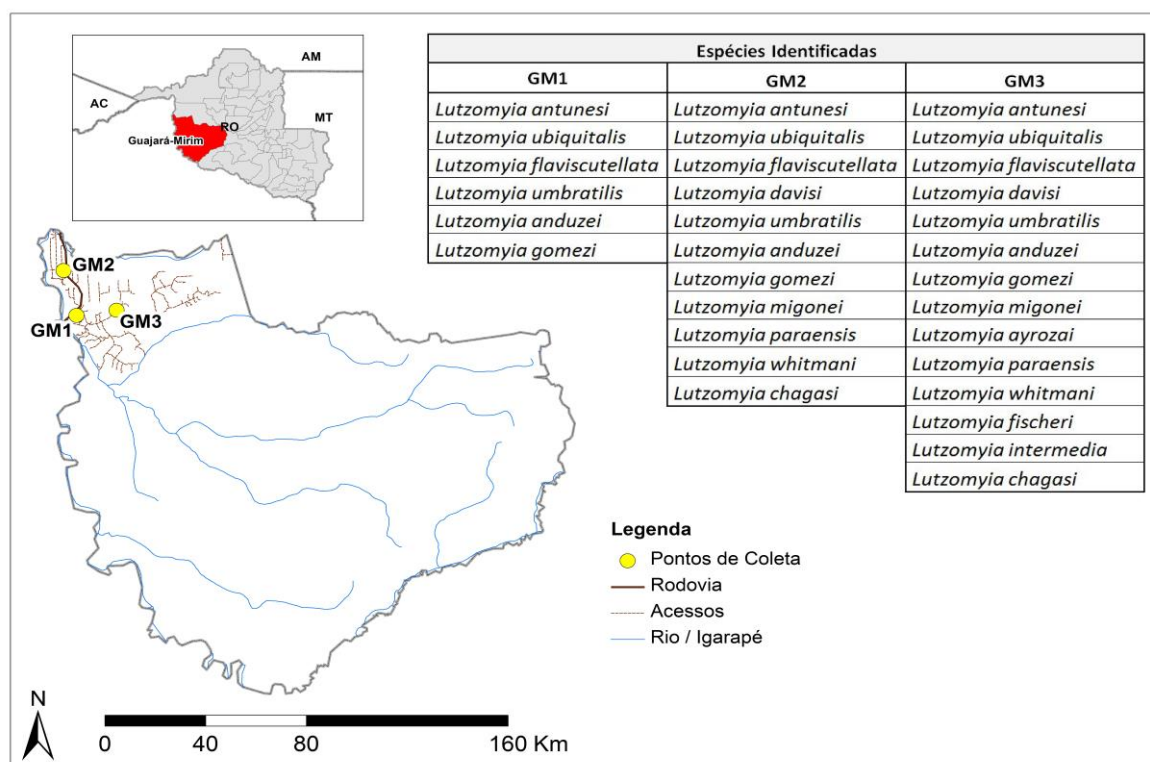


FIGURA 23. Distribuição dos potenciais vetores da LTA no município Guajará Mirim coletados no período de agosto de 2010 a dezembro de 2011. Adaptado por Fabio Medeiros da Costa e Leandro Pieroni em 2013

Quando se realizou a avaliação dos flebotomíneos por localidade de estudo no município de Guajará Mirim (**GM1**, **GM2** e **GM3**), observou-se que das 55 espécies caracterizadas, apenas 10 foram encontradas em ambas as áreas e seis destas (*Lu. antunesi*, *Lu. ubiquitalis*, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei*, *Lu. gomezi*) foram identificadas como vetorais potenciais de pelo menos uma espécie de *Leishmania*.

Na localidade **GM1**, foram capturadas um total de 912 espécimes. Destes, 890 flebótomos conseguiu-se caracterizar até o nível de espécie. Além disso, a fauna flebotomínica de **GM1** era constituída de 22 espécies diferentes, com seis espécies incriminadas na transmissão da LTA (*Lu. antunesi*, *Lu. ubiquitalis*, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei*, *Lutzomyia gomezi*). Ao estudar a localidade **GM2**, verificou-se que a fauna flebotomínica era composta de 31 espécies diferentes, sendo onze delas consideradas como vetorais potenciais das leishmanioses (*Lu. antunesi*, *Lu. ubiquitalis*, *Lu. chagasi*, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. davis*, *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei*, *Lu. gomezi*, *Lu. migonei*, *Lu. paraenses*

e *Lu. whitmani*) (**FIGURA 23**). Ao passo que a terceira área do estudo, **GM3**, caracterizou-se 39 espécies diferentes em uma população de 532 flebótomos. Dentro desta fauna, verificou-se que 14 delas estavam entre os dípteros de importância ao ciclo de transmissão da LTA (**FIGURA 24**).

Além da caracterização da fauna flebotomínica, foi realizada, no estudo, a análise comparativa da diversidade de espécies e a identificação dos flebótomos mais predominantes em cada localidade. Das três áreas estudadas no município de Guajará Mirim, a que apresentou maior diversidade de espécies foi **GM3** (39 espécies) e o maior número de espécies com potencial de transmitir a *Leishmania* em humanos (14 espécies) (**FIGURA 24**). Diferentemente, **GM1**, apesar de apresentar a fauna com maior número de flebótomos capturados, foi a localidade que apresentou o menor número de espécies identificadas (22 espécies), assim como, a menor em quantidade de dípteros incriminados na transmissão da LTA (6 espécies). A localidade **GM2** foi a que demonstrou a população mais homogênea na distribuição dos flebotomíneos, mesmo apresentando 31 espécies diferentes (**FIGURA 24**). Apesar de ter sido observado a presença de no mínimo 22 espécies diferentes nas áreas estudadas, observou-se que houve a predominância de duas espécies neste município, sendo a *Lu. antunesi* encontrada em maior número em **GM1** e **GM3** e a terceira em **GM2** (**TABELA 9**). E na localidade **GM2**, a espécie mais caracterizada foi *Lu. sherlocki*.

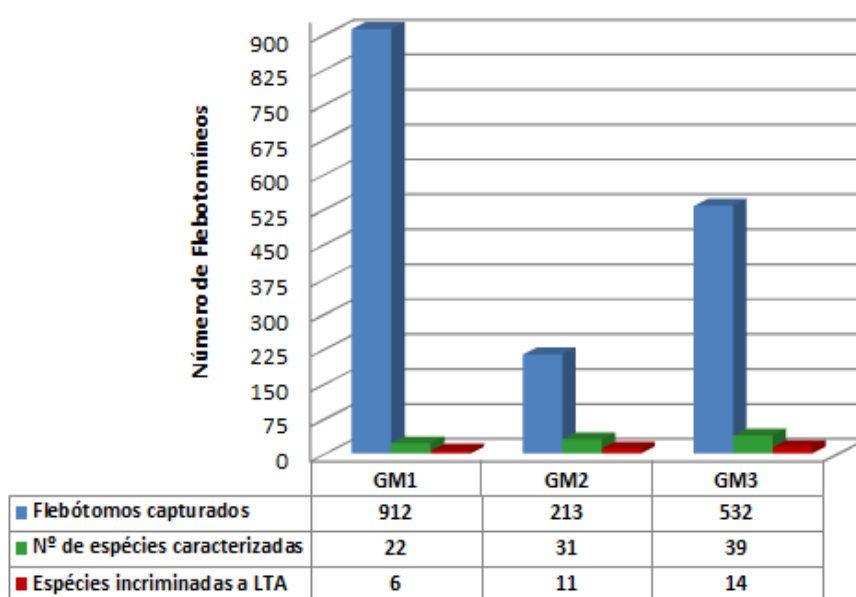


FIGURA 24. Caracterização da fauna flebotomínica nas localidades (GM1, GM2, GM3) do município de Guajará Mirim, Rondônia.

TABELA 9. Total de espécies de flebotomíneos coletados nas três localidades do município de Guajará Mirim, Rondônia, Brasil, no período de agosto de 2010 a dezembro de 2011.

ESPÉCIE	LOCALIDADE						TOTAL
	GM1		GM2		GM3		
	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	
<i>Lutzomyia antunesi</i>	245	520	9	18	184	29	1005
<i>Lutzomyia sherlocki</i>	1	34	2	40	1	1	79
<i>Lutzomyia ubiquitalis</i>	5	15	2	-	14	19	55
<i>Lutzomyia chagasi</i>	-	-	23	6	20	3	52
<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	7	-	7	2	19	1	36
<i>Lutzomyia davisii</i>	-	-	6	5	13	5	29
<i>Lutzomyia umbratilis</i>	1	7	1	3	6	11	29
<i>Lutzomyia amazonensis</i>	4	2	6	7	6	3	28
<i>Lutzomyia anduzei</i>	-	10	-	4	-	10	24
<i>Lutzomyia sordellii</i>	8	-	1	-	6	-	15
<i>Lutzomyia inflata</i>	-	1	-	-	10	3	14
<i>Lutzomyia begoniae</i>	8	-	-	-	4	-	12
<i>Lutzomyia gomezi</i>	-	4	5	-	1	-	10
<i>Lutzomyia migonei</i>	-	-	-	5	2	3	10
<i>Lutzomyia saulensis</i>	3	-	2	1	4	-	10
<i>Lutzomyia flochi</i>	-	-	-	7	-	2	9
<i>Lutzomyia octavioi</i>	-	-	-	8	-	-	8
<i>Lutzomyia nevesi</i>	-	-	2	-	4	-	6
<i>Lutzomyia falcata</i>	-	-	1	-	4	-	5
<i>Lutzomyia readyi</i>	-	3	-	-	-	2	5
<i>Lutzomyia reducta</i>	-	-	-	5	-	-	5
<i>Lutzomyia bispinosa</i>	-	-	4	-	-	-	4
<i>Lutzomyia lenti</i>	-	-	1	-	-	3	4
<i>Lutzomyia evangelistai</i>	-	-	-	-	4	-	4
<i>Lutzomyia auraensis</i>	-	-	-	2	-	1	3
<i>Lutzomyia ayrozai</i>	-	-	-	-	3	-	3
<i>Lutzomyia baculus</i>	1	-	-	-	2	-	3
<i>Lutzomyia choti</i>	-	-	2	1	-	-	3
<i>Lutzomyia tuberculata</i>	2	1	-	-	-	-	3
<i>Lutzomyia yuilli yuilli</i>	1	-	-	-	1	1	3
Outras	6	1	5	4	11	4	31
SUBTOTAL	292	598	79	118	319	101	1507
MII	13	8	2	-	50	10	83
<i>Lutzomyia sp</i>	0	1	13	1	48	4	67
TOTAL GERAL	305	607	94	119	417	115	1657

MII - Material Impróprio para Identificação

No tocante a localização dos ambientes de coleta dos flebótomos, observou-se que as espécies *Lu. antunesi*, *Lu. ubiquitalis* e *Lu. umbratilis* foram capturadas em galinheiros, bananal, peridomicílio, beira da mata, perto de igarapés, dentro da mata no solo e a uma altura de aproximadamente 9 metros do solo em **GM1** e **GM3**. Já as espécies *Lu. anduzei* e *Lu. migonei* foram identificadas em locais do peridomicílio, beira e dentro da mata de todas as três localidades estudadas. Na localidade **GM3**, as espécies *Lu. antunesi*, *Lu. ubiquitalis*, *Lu. anduzei* e *Lu. migonei* foram capturas encontrados próximos a residência do paciente com leishmaniose. Nesta mesma, conseguiu-se capturar no interior do domicílio um único espécime macho, caracterizado como *Lutzomyia lenti*.

Em Candeias do Jamari, foram realizadas cinco coletas no período de novembro/2010 a maio/2011, com 24 armadilhas instaladas. Neste município, foram capturados 221 flebótomos e identificadas 22 espécies diferentes, das quais sete (*Lu. antunesi*, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. olmeca nociva*, *Lu. ubiquitalis*, *Lu. chagasi*, *Lu. umbratilis*, e *Lu. davis*) são reconhecidas como potencialmente vetoras da LTA (**FIGURA 25** e **TABELA 10**). Observou-se, ainda nesta cidade, que a espécie predominante foi a *Lu. antunesi* com 129 exemplares, sendo encontrada em todos os pontos de coletas, em que foram colocadas armadilhas (abrigos de animais, peridomicílio, beira e interior da mata, solo e copa das árvores).

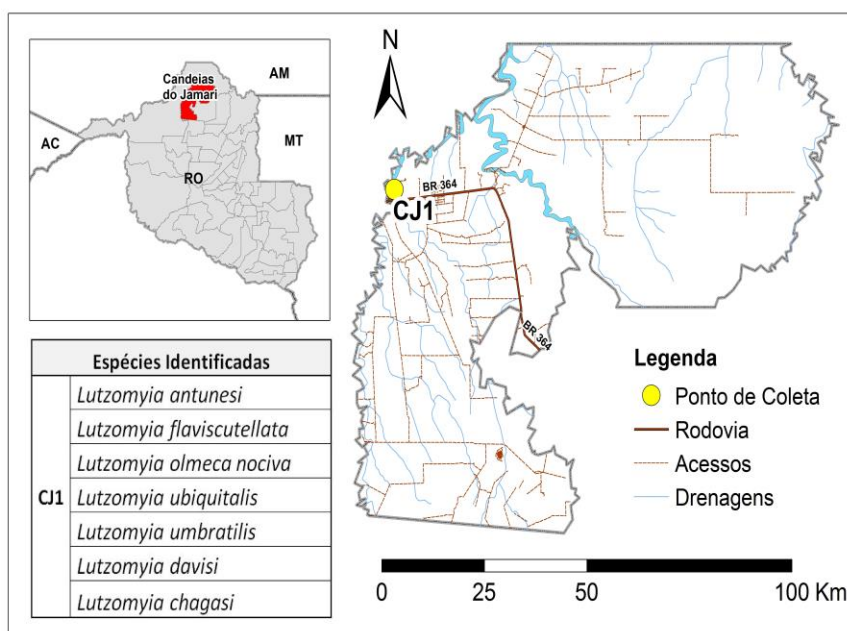


FIGURA 25. Distribuição dos potenciais vetores da LTA no município de Candeias do Jamari coletados no período de novembro de 2010 a maio de 2011. Adaptado por Fabio Medeiros da Costa e Leandro Pieroni em 2013

TABELA 10. Espécies de flebotomíneos coletados no município de Candeias do Jamari, Rondônia, Brasil, no período de novembro de 2010 a maio de 2011.

ESPÉCIE	SEXO		TOTAL
	Fêmea	Macho	
<i>Lutzomyia antunesi</i>	100	29	129
<i>Lutzomyia saulensis</i>	16	-	16
<i>Lutzomyia umbratilis</i>	1	11	12
<i>Lutzomyia davisii</i>	5	3	8
<i>Lutzomyia amazonensis</i>	2	6	8
<i>Lutzomyia sordelli</i>	7	-	7
<i>Lutzomyia ubiquitalis</i>	6	1	7
<i>Lutzomyia chagasi</i>	3	3	6
<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	5	-	5
<i>Lutzomyia begoniae</i>	2	-	2
<i>Lutzomyia chovi</i>	-	2	2
<i>Lutzomyia olmeca nociva</i>	-	2	2
<i>Lutzomyia castroi</i>	-	1	1
<i>Lutzomyia dreisbachi</i>	-	1	1
<i>Lutzomyia evandroi</i>	1	-	1
<i>Lutzomyia falcata</i>	1	-	1
<i>Lutzomyia fluviatilis</i>	1	-	1
<i>Lutzomyia hernandezi</i>	-	1	1
<i>Lutzomyia inflata</i>	1	-	1
<i>Lutzomyia pinotti</i>	-	1	1
<i>Lutzomyia preclara</i>	1	-	1
<i>Lutzomyia trispinosa</i>	-	1	1
Subtotal	152	62	214
<i>Lutzomyia sp</i>	1	-	1
MMI	6	-	6
TOTAL	159	62	221

MMI - Material Impróprio para Identificação

7. DISCUSSÃO

7.1 Perfil epidemiológico e clínico da população com LTA do estudo

Apesar da importância da LTA no Estado, poucos estudos foram realizados para a verificação da real situação de casos novos, espécies de *Leishmania* circulante e flebótomos envolvidos. Na literatura sobre leishmaniose na Amazônia, poucos trabalhos sobre o assunto podem ser encontrados (SILVEIRA et al, 1998; ROMERO et al, 2002a; TOJAL DA SILVA et al, 2006; CARVALHO et al, 2010). Particularmente, sobre o estado de Rondônia o número é ainda menor (GRIMALDI; TESH; McMAHON-PRATT, 1989; GRIMALDI et al., 1991; NAIFF et al, 1991; GIL et al, 2003; SHAW et al, 2007; TELES et al, 2013). Isto se deve, em parte, por Rondônia apresentar taxas expressivas de malária, e a maior parte da atenção em saúde voltada para a detecção, tratamento e controle dessa enfermidade. Contudo, não se pode esquecer que a população, devido às características de habitação e ocupação do solo, está sob o risco não só de contrair malária, mas também outras infecções, como a LTA.

Em Rondônia, no período de 2008 a 2012 foram notificados 5287 de LTA, com uma média de 1057,4 casos/anuais. Nestes últimos 5 anos os maiores índices da doença foram observados nos municípios de Porto Velho ($\chi=129$ casos), Vilhena ($\chi=127,8$ casos), Ariquemes ($\chi=59$ casos) e Cacoal ($\chi=53$ casos). Apesar de apresentar elevado número de casos, o Programa Estadual de Vigilância e Controle das Leishmanioses não possui informações sobre as espécies que estariam causando a enfermidade nos humanos (comunicação pessoal)¹.

No estudo, participaram sete unidades de saúde de seis municípios do estado. Porém, ao avaliar a origem das amostras, observou-se que estas provieram de 18 cidades diferentes, sendo que a maioria delas, quase 80% do material analisado, pertencia a pacientes residentes em áreas dos municípios de Porto Velho, Vilhena, Ariquemes e Ji-Paraná. Além disso, o somatório do número de casos notificados destes quatro municípios representaram aproximadamente 32% (1271 casos) dos casos notificados no estado nos últimos quatro anos (comunicação pessoal)¹.

Os dados demonstraram que a população estudada, em sua maioria, eram homens com idades entre 21 a 50 anos, que tinham fundamental incompleto (até o 9º ano), e desenvolviam alguma atividade agropecuária ou de lazer em ambientes rurais ou silvestres. Este perfil foi semelhante aos observados por Correa (2007) quando avaliou os aspectos epidemiológicos da

¹ Informação fornecida por Eleildon Mendes Ramos na Agência Estadual de Vigilância em Saúde, em fevereiro de 2013

população estudada nos municípios do subespaço 07 (Colorado D'Oeste e Cerejeiras) e 08 (Vilhena e Chupinguaia) do estado de Rondônia. Tojal da Silva et al (2006), ao estudar a diversidade de espécies de *Leishmania* causadoras de LTA em humanos no Rio Branco, Acre, também detectou que a maioria do sexo masculino que residiam em áreas rurais, entretanto, a média de idade encontrada nos homens foi de 18 anos, inferior ao encontrado em nosso estudo. Silva e Muniz (2009), ao analisar os casos humanos de LTA nas cinco microrregiões do Estado do Acre, verificou que 68% dos homens eram acometidos pela doença e que a média geral da idade foi de 26,6 anos, média maior que observado na pesquisa de Tojal da Silva et al. (2006) (18 anos), porém inferior aos observado nos trabalhos de Correa (2007) (32,6 anos), Coelho et al., (2011) (31,6 anos) e em nosso estudo (34,77 anos).

No estudo, verificou-se que a maioria das amostras avaliadas (59,72%) pertencia a indivíduos que tinham no máximo o ensino fundamental. Estes dados são similares com os achados de Silva e Muniz (2009), no qual observaram que menos de 40% da população estudada tinham concluído o ensino fundamental. Porém, este percentual foi bem inferior ao encontrado por Correa (2007), que observou valores de 77,4% (subespaço 8) a 91,6% (subespaço7) com até o ensino fundamental concluído. Estes dados corroboram com o que é descrito na literatura, onde a população acometida por LTA, normalmente, é caracterizada por apresentar baixa escolaridade (PASSOS et al., 2001; PIRES, 2005; PIAZZOLLA, 2007; CRUZ, 2008; CORRÊA et al., 2011; MIRANDA et al., 2011; SILVA; GURGEL, 2013), isto é especialmente evidenciado na região amazônica (TOJAL DA SILVA et al, 2006; CORREA, 2007; CHAVES, 2007; SILVA; MUNIZ, 2009).

O perfil da população encontrada no trabalho, sugere que a LTA no estado, ainda, é uma enfermidade ocupacional, que acomete homens na idade produtiva que trabalham em alguma atividade agropecuária, de extrativismo mineral, vegetal, funções que não precisam de mão de obra especializada. Esta característica é observada na maioria dos estados do território brasileiro (TOLEZANO, 1994; PASSOS, 2003; D'ÁVILA, et al. 2004; GUIMARÃES et al., 2005; NAME et al., 2005; BRASIL, 2007a; PELOSO, 2007; SILVA; MUNIZ, 2009; CARVALHO et al., 2010; COELHO, 2010). Contudo, observa-se uma mudança na ecoepidemiologia desta enfermidade, que está sendo influenciada pela ação antrópica, através do crescimento desordenado das cidades. As populações acabam invadindo, e consequentemente, destruindo a vegetação primária, assim como a fauna que serviam de fonte de alimentação dos flebótomos. Desta forma, forçam a estes vetores a se adaptar, modificando o perfil de transmissão da doença. Esta alteração é bastante evidente em áreas de colonização antiga de países da América do Sul e em alguns estados do Brasil (SAMPAIO; PAULA,

1999; SALOMÓN et al., 2006; SILVA; CUNHA, 2007; SOUZA, 2007; MIRANDA et al., 2011).

No tocante ao aspecto clínico, identificou-se, na pesquisa, um predomínio de lesões cutâneas únicas distribuídas nos membros inferiores. Quando comparados os resultados do experimento com os achados nos trabalhos de Shaw et al. (2007), que foram realizados no município de Monte Negro, Rondônia e de Correa (2007), executados em quatro municípios do Estado (Cerejeiras, Colorado D'Oeste, Vilhena e Chupinguaia), observou-se que os pacientes dessas pesquisas, apresentaram o mesmo perfil clínico dos pacientes avaliados em nosso estudo, ou seja, a predominância da leishmaniose cutânea com lesões únicas, localizadas nos membros inferiores. Além disso, as pesquisas de Oliveira-Neto et al (1998) no Rio de Janeiro, Jones et al. (1987) na Bahia, Tojal da Silva et al (2006) no Acre, Chaves (2007) no Amapá, Curti et al. (2009) no Paraná, Naiff Júnior et al (2009) no Amazonas, Bacha (2009) no Pará e Coelho et al. (2011) no Amazonas, também demonstraram resultados similares aos observados no presente estudo. A presença das lesões nos membros inferiores e superiores de pacientes com LTA, possivelmente, ocorre devido a dois fatores. Primeiro, estas áreas do corpo são, normalmente, as regiões mais expostas e desprovidas de vestimentas, que o indivíduo ao adentrar no ambiente silvestre para realização de atividades agropecuaristas, extrativistas ou mesmo de lazer (ecoturismo, caça, pesca) facilitam a hematofagia do flebotomíneo. Tal afirmação é reforçada pelo número de casos do sexo masculino (34,82%) que desempenhavam atividades extradomicílio (atividades associadas à agricultura, pecuária ou extrativismo). Adicionalmente, alguns estudos observaram que áreas cuja população predominante é agrícola, a incidência de casos de LTA apresentando lesões ulceradas nos membros é superior a 90% (FRANÇA et al., 2009; NESSER, 2009). E, o segundo fator, que poderia explicar o maior número de casos de lesões nos membros é a própria morfologia do vetor, uma vez que este apresenta um tamanho diminuto não superior a 4 mm de comprimento (REY, 2001; RANGEL; LAINSON, 2003), com aparelho bucal desenvolvido para picar superficialmente a derme, preferindo, portanto, as regiões do corpo desprotegidas.

Outro dado importante encontrado no trabalho foi o percentual de indivíduos com Leishmaniose Mucosa (2,61%). Estes resultados foram inferiores aos observados nas pesquisas de Passos et al (2001) (6,5%) e de França et al (2009) (5,9%). Name et al. (2005), detectou um índice superior a 40% de pacientes com forma mucosa dos casos atendidos no Distrito Federal. Ao passo que Silva e Muniz (2009) no Acre, encontrou, percentuais diferentes, que variaram de zero a 60% de casos com LM. A variabilidade de resultados encontrados nestes autores, possivelmente, está associada a espécie de *Leishmania* infectante,

a imunocompetência do hospedeiro e ao acesso a assistência médica. Além destes fatores, Silva e Muniz (2009), relatou que a variação no número de casos de LTA estava relacionada ao período do ano e ao ambiente de exposição dos pacientes. Isto se deve, em parte, pela principal espécie causadora da LM, *L. (V) braziliensis*, apresentar uma variedade flebótomos capazes de vincular este protozoário aos humanos. Estes dípteros, por sua vez, possuem nicho ecológico, habitat e predileção alimentar específica, resultando em ciclos de transmissão também diferentes (RANGEL; LAINSON, 2003; BRASIL, 2007b; GUERRA et al, 2011). Outra duas espécies podem ocasionalmente causar a LM, são elas: *L. (V) guyanensis* e *L. (L) amazonensis* (NAIFF; TALHARI; BARRETT, 1988; BARRAL et al., 1999; BRASIL, 2007a; DINIZ; COSTA; GONÇALVES, 2011; GUERRA et al., 2011). A maior incidência da LM causada por outra espécie de *Leishmania* ocorre na região amazônica (NAIFF; TALHARI; BARRETT, 1988; ROMERO, et al., 2002b; GUERRA et al., 2011). Isto ocorre porque a *L.(V) guyanensis* é a que mais causa a LTA naquela região.

Convém salientar, que a maioria dos casos de LM observado na pesquisa apresentava histórico de leishmaniose cutânea com cura espontânea ou a permanência de lesões por períodos superiores a 4 meses. No Brasil, estima-se que até 5% dos indivíduos com lesões clássicas (úlceras) causadas por *L. (V) braziliensis* irão desenvolver posteriormente lesões na mucosa, independente ter recebido o tratamento convencional completo ou não (BRASIL, 2007b, LESSA et al., 2007; DINIZ; COSTA; GONÇALVES, 2011). Este fenômeno ocorre, possivelmente, devido a não eliminação completa do protozoário que após cura clínica da lesão, a *Leishmania* pode por via hematogênica ou linfática ir a outras regiões do corpo, como as mucosas oral, nasal e genital (SARAIVA et al., 1990; GUEVARA et al., 1993; GUEVARA et al., 1994).

Schubach et al., (1998) e Mendonça et al (2004) analisando biopsia de cicatrizes de pacientes de Leishmaniose Cutânea após tratamento convencional, encontraram na maioria do material estudado a presença de DNA deste protozoário. Além disso, conseguiram isolar a *Leishmania* em meio NNN, confirmando que a cura clínica (cicatrização) não elimina totalmente as formas amastigotas na lesão (MOTA; MIRANDA, 2011). Estes dados corroboram com os relatos descritos pelos pacientes no estudo, onde mencionavam que lesões cicatrizadas após sofrerem alguma injúria, desenvolveram-se novamente ou surgiam novas lesões na circunvizinhança da cicatriz.

Além da forma cutânea clássica e mucosa da LTA, no estudo foi encontrada uma terceira forma clínica atípica observada em um paciente natural e residente em uma propriedade rural próxima a uma reserva ecológica do município de Guajará Mirim. O

paciente apresentava lesões cutâneas nodulares, confluentes na região distal e anterior da coxa direita, lobo auricular direito e hélice do pavilhão auricular esquerdo. Em seu histórico, foi observado a não reatividade na IDRM, positividade no parasitológico direto em lâmina com elevado número de parasita e tratamento em duas ocasiões diferentes com antimoniato de n-metilglucamina.

O diagnóstico da enfermidade neste paciente, foi confirmado pelos exames parasitológico direto em lâmina (PDL), isolamento do parasita em meio bifásico (NNN solidificado + meio líquido Schneider® acrescidos de 20% de soro fetal bovino, 2% de urina e antibióticos), animais de laboratório (camundongos balb/c), PCRs (PCR-kDNA, PCR-ITS-1 e PCR-HSP70p4) e identificação da espécie *L. (L) amazonensis* por RFLP dos produtos das PCR-ITS-1 e PCR-HSP70p4, por análise eletroforética de isoenzimas (MLEE) e por sequenciamento genômico. Para complementação do diagnóstico, foi realizada uma quantificação de 17 citocinas e quimiocinas plasmáticas deste paciente. Neste painel, observou-se baixa produção de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-1 β , IL-5, IL-13, GM-CSF, G-CSF e IL-10 (Aprigio et al. – artigo submetido. ANEXO 5).

A baixa produção de IFN- γ , IL-2, TNF- α , normalmente é encontrado em pacientes com Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), pois a resposta imunocelular específica, tipo Th1, contra os antígenos da *Leishmania* é ineficiente ou não é existente (BARRAL; BARRAL-NETO, 2009; PIRES et al., 2012). Aliado a isto, o estudo de Moraes e Silveira (1994) avaliando pacientes com leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L) amazonensis* apresentaram um índice elevado de IDRM negativas (50%) e com uma carga parasitária elevada na lesão, resultados que são encontrados em pacientes com LCD. Constatou-se, também, que a eficácia da infecção por esta espécie de protozoário está associada a falhas na expressão e capacidade do organismo responder a substâncias como IFN- γ , IL-4 e IL-12 como importantes no desenvolvimento da resposta imune celular Th1 (CÔRTEZ, 2008; JI et al., 2002, JI et al., 2003). Diante das características clínicas, histórico de sucessivos tratamentos, insensibilização a vários testes de IDRM e achados laboratoriais (parasitológico com abundância de amastigotas, isolamento e caracterização da *L. (L) amazonensis* e baixa produção de citocinas da resposta tipo Th1), esta forma atípica da Leishmaniose, trata-se, de uma forma clínica incomum denominada de Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), também chamada de Leishmaniose Anérgica, sendo este o primeiro caso no Estado de Rondônia com a descrição clínica e laboratorial (Aprigio et al. – artigo submetido. ANEXO 5).

A LCD é uma forma clínica considerada rara, com poucos casos identificados no mundo inteiro (COSTA, 1998; SALDANHA et al, 2009). No Brasil, até 2009, foram detectados

apenas 40, sendo a maioria encontrada nos estados do Maranhão e Pará (COSTA et al., 2009). Esta forma clínica é causada por espécies do subgênero *Leishmania*, e no Brasil a única espécie incriminada foi a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LAINSON et al., 1986; COSTA et al., 2009; SILVEIRA, 2009). Clinicamente, é caracterizada por apresentar lesões tuberculares, nódulos, infiltrações difusas e de aspecto tumoral que pode se desenvolver por todo corpo (COSTA et al., 2009). Apresenta, também, grande riqueza parasitária nas lesões e, na maioria das vezes, o sistema imune mediado por células, tipo Th1, não responde ao estímulo de antígenos da *L. (L.) amazonensis*. Consequentemente, é observado o insucesso no tratamento utilizado, apresentando, na maioria das vezes, apenas uma melhora clínica ou recidivas (LAINSON et al., 1986; COSTA et al., 2009; SILVEIRA, 2009).

7.2 Métodos de diagnósticos

Após a realização da análise clínica e epidemiológica dos pacientes, o estudo seguiu com a realização dos exames laboratoriais de 240 amostras oriundas de sete unidades de saúde de seis municípios. Destas amostras, 217 (90,42%) foram positivas no exame parasitológico direto em lâmina. Este exame é um dos métodos preconizados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da leishmaniose, por ser simples, de fácil execução, resultado rápido, altamente específico e sem a necessidade de uma estrutura ou equipamentos sofisticados (AVILES et al., 1999; BRASIL, 2007a). Entretanto, apresenta como principal desvantagem a baixa sensibilidade (18 a 52%) que está diretamente influenciada pelo tempo, tipo e quadro dermatológico da lesão, espécie da *Leishmania*, qualidade da coleta e experiência do técnico (AVILES et al., 1999; SAMPAIO et al., 2002; BRASIL, 2007a; POURMOHAMMADI et al., 2010). A detecção do parasito por esta técnica é inversamente proporcional ao tempo da lesão, sendo alta (até 100%) nos primeiros 2 meses e muito difícil em lesões superiores a 12 meses (GONTIJO; CARVALHO, 2003; ANDRADE et al., 2007).

Apesar das desvantagens, o Programa Estadual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana do Estado de Rondônia, preconizou uso do teste parasitológico direto em lâmina como método de diagnóstico de rotina na rede pública de saúde no Estado. Em Rondônia, no entanto, a realização desta técnica em pacientes com lesões recentes (até 2 meses de evolução) é limitado, uma vez que a característica do ciclo de transmissão da doença no Estado é predominantemente rural/silvestre, tal qual observado neste estudo. Acometem, em sua maioria, indivíduos que desempenham atividades agrícolas e/ou extrativistas em locais de difícil acesso e sem assistência hospitalar. As consequências disto são: pacientes que

buscam a assistência médica tardiamente, resultados falsos negativos, subnotificação da enfermidade e fragilidade na vigilância, profilaxia e controle da LTA. Portanto, a necessidade de execução de outro teste de diagnóstico para este agravo é essencial. O objetivo do estudo foi justamente utilizar uma técnica laboratorial que pudesse complementar a rotina de diagnóstico e da vigilância da LTA no Estado. Para tanto, o exame parasitológico direto em lâmina foi utilizado como padrão para comparar a sensibilidade das técnicas laboratoriais realizadas em nosso experimento.

Quando se comparou os resultados das amostras positivas da PDL com as outras técnicas de identificação direta do protozoário, observou-se que apenas 25,71% no meio de cultura bifásico (NNN + Schineider's® completo) e 6,66% na inoculação em camundongo Balb/c foram similares. Além dessa elevada divergência entre os resultados com o PDL, as técnicas de inoculação em camundongo e cultivo em meio bifásico apresentaram uma baixa positividade, obtendo apenas 28,57% e 10% entre as amostras reagentes, respectivamente.

A técnica de meio de cultura quando utilizada como diagnóstico é considerada como padrão ouro, por apresentar 100% especificidade (BENSOUSSAN et al., 2006; REITHIGER et al. 2007). Este procedimento, além de confirmar o diagnóstico clínico, permite a preservação dos isolados, possibilitando a utilização destes para outras finalidades (MELLO, 2009). Contudo, para a sua realização, é requerida uma infraestrutura adequada, com equipamentos que normalmente não estão nos laboratórios da rede pública e a necessidade de pessoal capacitado (GONTIJO; CARVALHO, 2003). A sensibilidade desta técnica varia de acordo com a espécie isolada, o material colhido e o meio de cultura utilizado (CUBA et al., 1986; BENSOUSSAN et al., 2006). Adicionalmente, o tempo para visualização das leishmanias no meio de cultura pode variar de 2 a 29 dias, que também é dependente da espécie de *Leishmania* isolada (CUBA et al., 1986; AMPUERO et al., 2009).

No presente estudo, a *L. (L) amazonensis* foi visualizada normalmente no 3º dia após o semeio e apresentou numerosas formas amastigotas partir do 5º dia. Já a *L. (V) braziliensis* levou em média 12 dias para surgir (dado não demonstrado). Estes achados corroboram com os observados nos trabalhos de Dorval et al (2006) e Laison, Ryan e Shaw, 1987. Neste tipo de metodologia as leishmanias do subgênero *Leishmania* são as que melhor se adaptam a estes meios desenvolvendo formas promastigotas a partir do 1º dia de cultura e, normalmente, apresentam abundância de parasita nestes meios. Diferentemente, as leishmanias do subgênero *Viannia* tem dificuldade de se desenvolver, normalmente é necessário o enriquecimento do meio com outros fatores que auxiliam no crescimento (e.g. urina). E, mesmo assim, o crescimento é lento, podendo levar dias até o aparecimento de formas

promastigotas no meio. Além disso, a quantidade de protozoário observado é menor que nos meio com leishmanias do subgênero *Leishmania* (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987; CUBA, 2000).

No tocante a sensibilidade do meio bifásico utilizado no estudo, observou-se apenas 28,57% amostras foram positivas. Na literatura, a sensibilidade deste teste para a detecção das leishmanias está em torno de 50%. Entretanto, como mencionado, sofre influência do tipo de material colhido, a espécie de *Leishmania*, meio e o método de cultura utilizado (CUBA et al., 1986; WEIGLE et al., 2002; AMPUERO et al., 2009). No estudo, optou-se em utilizar escarificado e/ou punção do líquido intersticial da borda da lesão para realização da inoculação no meio bifásico, em virtude que a estrutura das unidades de saúde da rede pública estadual estão adaptadas para a rotina de diagnóstico da LTA, via PDL. O escarificado da borda da lesão não é estéril, mesmo que se realize a assepsia do local. Portanto, este foi um dos motivos do alto índice de contaminação bacteriana e fúngica encontrada nesta técnica (29,41%) e, por conseguinte, diminuiu a sensibilidade do teste. Apesar disso, Cuba et al. (1986) e Sampaio et al. (2002) mencionaram que em amostras de campo o percentual aceitável de contaminação esteja em torno de 24 a 33%, valores semelhantes ao encontrado em nosso estudo. Na pesquisa de Shaw et al. (2007) conseguiu-se isolar a *Leishmania* em meio de cultura de apenas sete amostras, o que representa apenas 8,64% da população estudada, índice bem menor ao encontrado em nosso estudo (20/70 amostras). Este mesmo autor, também utilizou outro método de identificação direta do parasita, a inoculação em animais de experimentação (*Mesocricetus auratus*), contudo, o índice de positividade também foi inferior a 13% (SHAW et al., 2007).

A inoculação em camundongo foi outra técnica utilizada como diagnóstico e isolamento das leishmanias no estudo. Esta técnica demonstrou o menor índice de positividade no trabalho (10% das amostras). O baixo percentual de positividade encontrada deveu-se, em parte, na escolha do modelo animal, onde os camundongos da linhagem Balb/c, são bastante sensíveis aos protozoários pertencentes ao subgênero *Leishmania* e pouco sensíveis as espécies do subgênero *Viannia* (CUBA et al., 1986; CUBA, 2000). De fato, em nosso estudo, os únicos isolados positivos na inoculação foram justamente de *L. (L) amazonensis*. Adicionalmente, a qualidade e a quantidade do material inoculado (aspirado ou escarificado), puderam ter favorecido o fracasso no isolamento de outras espécies de *Leishmania* (SINGH, 2006). Normalmente, para este procedimento a espécie de escolha é o Hamster (*Mesocricetus auratus*), animal sensível a maioria das espécies de *Leishmania* (BRASIL, 2007a). Entretanto, mesmo com a utilização do *Mesocricetus auratus*, esta técnica ainda apresenta desvantagens

como: a baixa sensibilidade, que varia de acordo com a espécie isolada (GONTIJO; CARVALHO, 2003); necessidade de espaço físico apropriado com controle ambiental (ar, temperatura e iluminação); a exposição do experimentador a infecções durante a inoculação do material contaminado (HERWALDT, 2001) e o tempo de aparecimento das lesões pode levar até nove meses (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Estas desvantagens torna a técnica inviável para ser utilizada como suporte na vigilância da LTA, ao passo que técnicas de biologia molecular, em especial a PCR, poderiam ser uma opção para desempenhar esta função.

As PCRs combinadas, diferentemente das técnicas de meio em cultura bifásico e inoculação em camundongo, apresentaram aproximadamente 68% de amostras positivas, sendo a segunda técnica com maior número de resultados positivos entre os testes realizados e, também, a técnica com a maior similaridade de resultados entre os obtidos no exame PDL (amostras positivas e negativas). Nos ensaios realizados com objetivo de avaliar a capacidade de detecção de *Leishmania* todas as 240 amostras foram submetidas aos três sistemas de PCR, apresentando uma positividade de 66,26%, 28,75 e 25,83%, respectivamente para PCR-kDNA, PCR-ITS-1 e PCR-HSP70p4. A PCR-kDNA foi a técnica de biologia molecular que mais identificou a presença de DNA leishmanial. Entretanto, este resultado foi inferior aos achados de Motazedian et al, (2002), os quais foram capazes de apresentar uma de similaridade de 100% entre os resultados da PCR-kDNA e PDL, quando o produto da extração foi obtido através da lise por digestão enzimática adicionados em tampão de lise, posteriormente, extraídos utilizando a técnica com fenol e clorofórmio. Volpini et al. (2006), utilizando os mesmo iniciadores para o kDNA, também, conseguiram resultados superiores aos obtidos em nosso estudo, detectando a presença de *Leishmania* em 70,2 a 93,7% das lâminas do teste PDL arquivadas de 1965 a 2001. Na pesquisa de Volpini et al (2006), verificou-se que o número de falsos negativos foi maior nas lâminas arquivadas por mais de 30 anos. Em nosso experimento, não foi possível visualizar em 23 lâminas, formas clássicas de amastigotas da *Leishmania*. Contudo, quando submetidas ao PCR, vinte delas foram positivas em pelo menos um dos três sistemas utilizados. Destes, o PCR-kDNA foi o que detectou o maior número de amostras (19/23). Cinco delas, também apresentaram resultados positivos na cultura e/ou na inoculação em camundongo. As amostras sem formas clássicas de amastigotas, eram oriundas pacientes que continham lesões com mais de 4 meses de evolução e infecções secundárias que possivelmente interferiram na qualidade e carga parasitária do material colhido, impossibilitando a observação das amastigotas, mas que foram suficiente para ser detectado na PCR. Esta afirmação corrobora com os achados de Motazedian et al,

2002, o qual também encontrou positividade em lâminas com amostras de pacientes com LTA crônica que foram previamente negativas no parasitológico direto. Nestas lesões a quantidade do parasita é pequena e, em algumas vezes, não detectada no PDL (SCHALLIG; OSKAM, 2002). Isto se torna mais evidente em lesões cujo agente etiológico seja a *L. (V) braziliensis* (AVILES et al, 1999; SAMPAIO et al., 2002; AMPUERO et al., 2009). No Brasil é estimado que até 5% dos casos de LTA na forma cutânea com lesão clássica irão evoluir para uma forma mais agressiva a leishmaniose mucocutânea, que além de ser de difícil confirmação no PDL, é mutilante, pode causar problemas de convivência social e é de difícil resposta terapêutica, necessitando aplicação de doses mais elevadas e, mesmo assim, ocorrem recidivas (BRASIL, 2007a; DINIZ; COSTA; GONÇALVES, 2011). Adicionalmente, pesquisadores conseguiram detectar a presença de *Leishmania* em lesão cicatrizada (SCHUBACH et al., 1998; MENDONÇA et al., 2004; MOTA; MIRANDA, 2011). Em nosso estudo, verificou-se que a espécie de *Leishmania* mais incidente nas amostras avaliadas foi justamente a *L. (V) braziliensis* (48,6% das amostras) e que as lesões com maiores tempo de evolução ($6,97 \pm 12,07$ meses) tinham, predominantemente, a *L. (V) braziliensis* como espécie caracterizada. Devido as característica, a técnica de PCR-kDNA seria uma ferramenta muito útil na detecção da presença da *Leishmania* nas lesões crônicas, de baixa parasitemia, e cujo agente fosse a *L. (V) braziliensis*. Por conseguinte, com o diagnóstico mais preciso, a terapêutica seria mais efetiva, minimizando a ocorrência de recidivas e, consequentemente, a possibilidade de evolução da doença para uma forma mucocutânea.

Outra situação observada no estudo foi a presença de 15 amostras que foram consideradas previamente positivas no PDL pelos técnicos dos postos municipais, mas na reavaliação demonstraram apenas formas sugestivas de amastigotas (ausência de alguma estrutura da amastigota), que quando submetidas a PCR-kDNA foram positivas. A não visualização das formas clássicas das leishmanias nestas lâminas ocorreu, possivelmente, devido ao pequeno número de amastigotas presentes no material colhido, que ao manusear constantemente (pelo menos cinco vezes), no processo de avaliação, teriam sido destruídas ou removidas da amostra existente na lâmina, impossibilitando a visualização na microscopia, mas sendo detectada na PCR-kDNA. Este resultado reforça a possibilidade da utilização da PCR-kDNA, na rotina dos laboratórios de referência como os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs), em vista que estes laboratórios funcionam como referência no controle de qualidade e validação de algumas análises dos laboratórios da rede estadual, inclusive para LTA. No Estado, o LACEN/RO, é responsável por avaliar a qualidade de todas as lâminas positivas e 10% das negativas que foram realizadas pelas unidades de saúde de todos os 52

municípios da rede estadual. E devido a precariedade da estrutura laboratorial destas unidades de saúde e desconhecimento das normas de controle de qualidade e rotatividade de recursos humanos, a qualidade da coleta do material e até mesmo acondicionamento destas lâminas poderiam prejudicar a qualidade do exame e consequentemente o resultado do exame ou a avaliação destas lâminas pelos técnicos do LACEN/RO. Os estudos de Ampuero et al (2009), Pourmohammadi et al, (2010), demonstraram uma maior positividade no diagnóstico da LTA quando combinaram os resultados das PCRs e PDL, chegando a ter uma sensibilidade de detecção deste parasita superior a 92%. Em vista da realidade da rede pública do Estado, dos resultados obtidos em nosso estudo e características da técnica de PCR, esta metodologia, em especial a PCR-kDNA, seria uma ótima ferramenta para auxiliar na avaliação destas lâminas.

No estudo o sistema PCR-kDNA apresentou 57 amostras negativas, que foram positivas no parasitológico. A maioria destas lâminas pertenciam aos grupos (+) e (++), com quantitativo de amastigotas inferior a 20 amastigotas/100 campos, possuíam as menores quantidades de material disperso na lâmina, menor número de amastigota, quantidade de DNA inferior a 2,5 ng/μL e menor grau de pureza. Estes achados aliados a perda de parte da amostra durante o processo de raspagem do material na lâmina poderiam ter influenciado na detecção da presença da *Leishmania* por esta técnica. Outros fatores que poderiam estar interferindo nos resultados da PCR-kDNA seriam a presença de substâncias capazes de inibir a Taq polimerase ou degradar o DNA leishmanial e o próprio estado de conservação das lâminas poderiam degradar o material genético da *Leishmania*, impedindo desta forma a detecção deste protozoário nesta técnica (LIMA, 2010b). Em nosso estudo foi observado que 11 lâminas que continham amostras com mais de 41 amastigotas/100 campos [grupo (+++)] e quantidade de DNA superior a 2,5 ng/μL foram negativas na PCR-kDNA, reforçando a hipótese citada anteriormente. Volpini et al.,(2006), também encontrou, em seu estudo, um número de amostras falsos negativas na PCR-kDNA, sendo que o percentual foi maior em material de lâminas acondicionadas por mais de 30 anos e armazenadas de forma inadequada.

A PCR-kDNA, no estudo, se apresentou como uma técnica de boa sensibilidade que poderia ser utilizada como ferramenta para o auxílio no diagnóstico e no controle de qualidade do teste de PDL e até mesmo utilizada como método de diagnóstico nos laboratórios de média e alta complexidade, como os LACENs. Esta técnica tem sido utilizada com êxito na identificação de espécies de *Leishmania* em regiões aonde há circulação de casos de leishmaniose causados apenas por *L. (V) braziliensis*, *L. (L) infatum chagasi* e *L. (L) amazonensis* (WEIGLE et al., 2002; PASSOS, 2003; DISCH, et al., 2005; VOLPINI et al., 2006; BRUSTOLONI et al, 2007; LIMA-JUNIOR et al., 2009; AMPUERO et al., 2009;

MARTINS; ALEXANDRINO; GUIMARÃES, 2010). Entretanto, este sistema não foi capaz de distinguir com eficiência as espécies de *Leishmania* do novo mundo, em especial as espécies do subgênero *Viannia* (FERNANDES et al, 1999; GRAÇA, 2011). Somando-se a isto, a PCR-kDNA não apresenta especificidade necessária para detectar a variedade genética de espécies de *Leishmania* suspeitas de existir no Estado de Rondônia (RODRIGUES et al., 2002). Desta forma, selecionou-se, no estudo, o segundo sistema de PCR que mais detectou a presença de *Leishmania* nas amostras estudadas (PCR-ITS-1).

Vários pesquisadores obtiveram sucesso em utilizar a PCR-ITS para o diagnóstico da LTA detectando espécies de leishmania tanto do velho e como do novo mundo (VAN EYS et al., 1992; SCHONIAN et al, 2003; BENSOUSSAN et al., 2006; KAZEMI-RAD et al., 2008; LEMRANI et al., 2009; BRITO et al., 2009; GRAÇA et al., 2012). Bensoussan et al., (2006), em sua pesquisa, comparou três testes de PCR (PCR-kDNA, PCR-ITS-1 e PCR-SLME) e observou, como em nosso estudo, uma sensibilidade de detecção de DNA leishmanial maior quando utilizou o PCR-kDNA, seguido pelo PCR-ITS-1. Entretanto, o percentual de positividade foi muito superior aos observados na nossa pesquisa, principalmente quando comparado com os ITS-1, que chegou a índice de amostras positivas de 91%. Bensoussan et al, (2006), também observou que não houve resultados falso positivo quando utilizou os iniciadores para amplificação da região ITS-1, reforçando ser um teste altamente específico. Quando este pesquisador usou esta técnica juntamente com a RFLP conseguiu-se identificar a espécie em aproximadamente 75% dos casos.

Kazemi-Rad et al., (2008) em seu estudo detectando leishmania em escarificado de lesão corada em lâmina, também, foi capaz de conseguir um percentual de positividade próximo aos noventa por cento (89,1%). Contudo, ao caracterizar a espécie do protozoário o índice não foi superior a 40%. No Brasil a PCR-ITS-1, já foi utilizada para detecção de *Leishmania* em pacientes no estado de Pernambuco (BRITO et al., 2009), em biopsias, cultura e material de lâmina corada (GRAÇA, 2011) com sensibilidade e especificidade variadas. Em nosso estudo, a capacidade de detecção do DNA leishmanial através da PCR-ITS-1, foi de apenas 28,75%, menor que os valores obtidos por Bensoussan et al, (2006), Kazemi-Rad et al., (2008) e BRITO et al., (2009). Este baixo índice de positividade, possivelmente está relacionado a qualidade do material extraído, tal qual foi mencionado anteriormente na técnica de PCR-kDNA. Contudo, AMATO et al., (2009), conseguiram bons resultados utilizando o sistema PCR- ITS-1 para identificação das espécies em material obtido de cortes de imunohistoquímica lâminas fixadas previamente em formalina.

A PCR-ITS-1, foi a técnica selecionada para realizar a identificação das espécies de leishmania nas amostras do estudo. Esta escolha levou em consideração o fato de ter sido a segunda técnica com maior número de detecção do DNA leishmanial e ser uma técnica que praticamente não apresentar resultados falsos positivos. Esta técnica quando associada a RFLP é capaz de identificar a maioria das leishmanias do novo mundo, inclusive as que estariam circulando no Estado. No entanto, para aumentar a sensibilidade do teste, resolveu-se realizar o 2º round da PCR-ITS-1. O produto desta segunda PCR que foi utilizada como substrato para a técnica de RFLP.

A PCR-RFLP, juntamente com o sequenciamento genômico dos amplicons do ITS-1 e HSP70p4, foram capazes de identificar as espécies de *Leishmania* em 73,7% das amostras. Destes conseguiu-se caracterizar 5 espécies em 47 amostras, sendo quatro pertencentes ao subgênero *Viannia* [*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) naiffi*] e uma ao subgênero *Leishmania* [*L. (L.) amazonensis*]. Em 23 amostras não foi possível diferenciar o perfil da espécie que ficou entre *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*. Shaw et al, (2007), pesquisando em biopsia de pacientes com LTA no município de Monte Negro do Rondônia, conseguiu identificar a espécie de *Leishmania* em 11/81 amostras, caracterizando apenas três espécies sendo todas do subgênero *Viannia*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni-like*, *L. (V.) lainsoni*; *L. (V.) guyanensis-like*. Castilho, Shaw e Floeter-Winter (2003), semelhantemente só detectaram espécies do subgênero *Viannia*, conseguindo caracterizar apenas 9 amostras, e todas eram *L. (V.) braziliensis*.

Guerra et al., 2011, utilizando amostras de pacientes oriundas de cinco municípios do Estado de Rondônia, também, identificou somente espécies do subgênero *Viannia*, sendo 4 classificadas como *L. (V.) braziliensis* e uma como *L. (V.) guyanensis*. Em nosso estudo encontramos amostras infectadas com *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) naiffi* e com perfis entre *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* que foram identificadas em pacientes da cidade de Ariquemes, município que faz fronteira com Monte Negro. Ao comparar os resultados de Castilho, Shaw e Floeter-Winter (2003), Shaw et al (2007) e Guerra et al, 2011 com os resultados obtidos em nosso trabalho, observou-se que naquela região há circulação de pelo menos quatro espécies de *Leishmania*.

Quando se relacionou a características a forma clínica da LTA dos pacientes com as espécies do protozoário identificadas no município de Ariquemes, observou-se que as lesões cutâneas predominaram nos membros superiores, sendo isolados delas as espécies de *L. (V.) braziliensis* e espécies com perfis entre *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*. A espécie *L. (V.) naiffi* foi isolada de amostras da lesão no pé direito do paciente. Diferentemente, no

trabalho de Shaw et al (2007), as lesões dos pacientes estavam situadas, predominantemente, nas pernas e, secundariamente, nos braços. Guerra et al., 2011, conseguiu caracterizar a *L. (V) guyanensis* em um paciente com lesão mucosa do município de Ariquemes. Esta cidade apresentou, nos últimos cinco anos, uma média de 59 casos anuais de LTA, com predominância de lesões cutâneas em homens que desempenham alguma atividade agrícola, pecuária ou de ecoturismo (AGEVISA/RO/SINAM/2012). Neste município e em áreas próxima a ele, foi observado a circulação de pelo menos 4 espécies de *Leishmania*, sendo que duas delas poderiam induzir a apresentação de quadros clínicos diferentes da doença (cutânea simples, cutânea múltipla, cutânea disseminada, cutânea com acometimento do sistema linfático e leishmaniose mucosa) que quando submetidas ao tratamento convencional apresentam respostas terapêuticas diferentes (BRASIL, 2007a; LIMA et al., 2007; OURIVES-NEVES et al, 2011). Outro aspecto que deve ser levado em consideração é o ciclo de transmissão das leishmanias identificadas neste município. Na literatura são enumeradas várias espécies de flebotomíneos com capacidade de transmitir pelo menos uma das quatro espécies identificadas, em especial a *L. (V) braziliensis* e *L. (V) guyanensis*. Estes pesquisadores além de descrever o potencial vetorial dos flebótomos, enfatizaram a capacidade destes dípteros em se adaptar ao ambiente antrópico e ao hábito de alimentação antropofílica (ANDRADE-FILHO et al., 2001; GIL et al., 2003, SOUZA et al., 2004; TEODORO et al, 2004; BRAGA-MIRANDA; MIRANDA; GALATI 2006; GIL et al., 2009, RANGEL; LAINSON, 2009; COLLA-JAQUES et al., 2010; TELES et al., 2013). Das quatro espécies isoladas na região de Ariquemes, a que tem maior número de vetores incriminados (mais de 10 espécies) em sua transmissão é a *L. (V) braziliensis*. Este protozoário é o principal agente causador da LTA no BRASIL, tendo sido encontrado, com frequência, em diferentes ambientes de todo território nacional (OLIVEIRA-NETO et al., 1998; SCHUBACH et al., 1998; BRASIL, 2007a; MARTINS; ALEXANDRINO; GUIMARÃES, 2010).

No estudo, *L. (V) braziliensis* foi identificada em 48,6% das amostras, sendo encontrada em material de lesão em pacientes de oito municípios. Entretanto, acredita-se que esteja circulando e causando a doença em todos os municípios do Estado. Os achados de Guerra et al., (2011) fortalecem esta ideia, este autor identificou a *L. (V) braziliensis* em biopsias de pacientes residentes no municípios de Ariquemes, Guajará Mirim, Jarú, Ouro Preto D'Oeste e Pimenta Bueno. Na nossa pesquisa foram observados perfis na PCR-RFLP que ficaram entre as espécies de *L.(V). braziliensis* e *L. (V) guyanensis*, que poderiam ser na verdade *L. (V) braziliensis*, se considerarmos somente as pesquisas de Castilho, Shaw e Floeter-Winter

(2003), Shaw et al (2007) e Guerra et al, 2011. Neste caso acrescentaríamos o município Candeia do Jamari, o que totalizaria 14 municípios com circulação confirmada desta *Leishmania*. Analisando a distribuição geográfica da *L. (V) braziliensis*, em relação aos municípios que apresentaram casos com esta espécie, reforça ainda mais a idéia da circulação desta espécie no estado.

A *L. (L) amazonensis* foi a segunda espécie mais identificada no estudo, sendo encontrada nos municípios de Porto Velho, Guajará Mirim e Vilhena. Este resultado contrasta com os observados por Shaw et al, (2007) em Monte Negro/RO e Tojal da Silva (2006) no Acre que não identificaram esta espécie em seus estudos. Para Coelho et al., (2011), em Manaus/AM, esta espécie foi apenas a terceira mais encontrada. A *L. (L) amazonensis* tem um papel importante na saúde pública, em vista deste agente causar uma forma rara da doença, Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), que induz anergia na reposta imune celular do indivíduo. Além disso, já foram encontrados casos de indivíduos com a forma mucosa causada por este parasito (BARRAL et al., 1999; BRASIL, 2007a). Na pesquisa, a maioria dos casos foi de lesão na parte superior do corpo, membros e face, com lesões simples e tempo médio de evolução de 3 meses. Estes resultados diferem da literatura que mencionam que as lesões causadas por esta espécie predominam em áreas abaixo da cintura, devido as característica dos principais vetores incriminados na transmissão desta enfermidade (BRASIL 2007a; LAINSON, 2010). Estes dípteros são de voos baixos preferindo se alimentar de roedores em vez dos humanos. Entretanto, experimentalmente Nieves e Pimenta (2000), conseguiu infectar em laboratório o *Lu. migonei* com *L. (L) amazonensis*, demonstrando a potencialidade de transmissão deste díptero o que poderia ser uma das explicações da localização das lesões nestes pacientes.

A presença da *L. (V) guyanensis* em amostras nos município de Porto Velho e Candeias do Jamari demonstra que esta espécie pode estar circulando em menor escala na região centro-norte do estado. Este dado também foi visualizado por Shaw et al, (2007) e Tojal da Silva (2006) que caracterizaram apenas uma amostra com esta espécie. Este resultado contrasta com os observados por Coelho et al., (2011), onde 73% das espécies caracterizadas eram *L. (V) guyanensis*. Clinicamente, os indivíduos acometidos por esta espécie podem apresentar lesões únicas, ou múltiplas, sendo esta última com mais frequência devido a várias picadas do vetor ou metástases linfáticas, com possibilidade de apresentação de linfagites (LAINSON, 2010). Guerra et al., (2011), todavia, identificou uma espécie em amostras de lesões mucosas de um indivíduo no Estado de Rondônia, ampliando a possibilidade da apresentação clínica por este protozoário.

Em uma amostra do estudo foi detectada a presença de *L. (V) naiiffi*, que é um achado pouco comum em casos de LTA em humanos no Brasil. Os poucos relatos foram descritos nos estados do Amazonas (FIGUEIRA et al., 2008), Pará e Rondônia, sendo neste último a identificação da espécie ocorreu em *Dasypus novemcinctus* (NAIFF et al., 1991). O número reduzido de casos detectados deve-se ao fato de que este protozoário possa induzir a uma infecção benigna que cura se de forma espontânea.

Outra espécie identificada na pesquisa foi *Leishmania (V.) lainsoni*. Conseguiu-se isolar esta espécie em cultura no meio bifásico, sendo, também, positiva em dois outros métodos de diagnóstico (parasitológico e PCR). Este material foi obtido de um paciente de 60 anos, residente em Porto Velho. Esta espécie foi caracterizada pela primeira vez por Silveira et al no ano de 1987 em pacientes residentes no estado do Pará. Posteriormente, em 1991, este mesmo pesquisador conseguiu isolar este protozoário de flebotomíneos (*Lu. ubiquitalis*) (Silveira et al., 1991b) e em pacas *Agouti paca* (Silveira et al., 1991a) ambos caracterizados no Estado do Pará. Com estes achados acreditava-se que esta espécie estava restrita apenas a este estado. Contudo, Tojal da Silva et al (2006) conseguiu caracterizar este protozoário em indivíduos no estado do Acre, sendo a segunda espécie mais caracterizada em seu estudo. Mais recentemente, Shaw et al (2007) identificou esta *Leishmania* no município de Monte Negro em Rondônia corroborando com os resultados do nosso estudo. Estes autores acreditam que a distribuição da *Leishmania (V) lainsoni* esteja intimamente ligada com seu reservatório (*Agouti paca*) e o principal vetor (*Lu. ubiquitalis*), estendendo-se por toda Amazônia Legal.

As leishmanias encontradas no presente estudo indicam um perfil diferente no ciclo de transmissão da LTA apresentado na região amazônica, no qual apresenta uma diversidade de espécies (até sete). Os autores em seus trabalhos observaram que a principal espécie causadora de LTA na região Amazônica é a *Leishmania (V) guyanensis* e secundariamente por *Leishmania (V) braziliensis* (ROMERO et al, 2002a; ROMERO et al, 2002b; VAN DER MEIDE et al, 2008; COELHO et al., 2011). A medida que vai mais para o sul desta região percebe-se uma alteração nas espécies causadoras de LTA em humanos, apresentando uma junção do perfil amazônico com o perfil observado em todo o país, onde há um predomínio de casos ocasionados pela *Leishmania (V.) braziliensis* e secundariamente por *Leishmania (L.) amazonensis* e casos esporádicos de outras espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* (OLIVEIRA-NETO et al., 1998; CASTRO et al., 2002; BRASIL, 2007a; SAMPAIO, et al., 2009).

7.3 Fauna flebotomínica identificada no estudo

O estudo também objetivou conhecer a distribuição do vetor transmissor da LTA. A pesquisa realizou um estudo da fauna flebotomínica em determinadas regiões dos municípios de Porto Velho, Candeias do Jamari e Guajará-Mirim. No município de Porto Velho, as espécies predominantes foram *Lu. antunesi*, *Lu. sordelli*, *Lu. amazonensis*, *Lu. chagasi* e *Lu. davisii*. Adicionalmente, a fauna flebotomínica nestes municípios apresentaram predominâncias de espécies diferentes, com apenas 6/20 espécies encontrada em ambas as áreas, mostrando heterogeneidade na sua distribuição. Este dado é reforçado, pelos achados de exemplares em uma área de treinamento da polícia militar, onde os flebotomíneos predominantes foram *Lu. umbratilis* e *Lu. ubiquitalis* (dados não publicados). Nestas áreas, foram encontradas espécies com hábitos antropofílicos e incriminadas na transmissão da LTA (*Lu. migonei*, *Lu. antunesi*, *Lu. ubiquitalis* (casos especiais), *Lu. anduzei*, *Lu. davisii*), tanto que em **PVH1** foi identificado um caso com LTA causada por *Leishmania (L) amazonensis*, demonstrando serem áreas com risco de transmissão desta enfermidade. O paciente em questão era do sexo masculino e idade de 29 anos apresentou LTA com lesão clássica única de aproximadamente 4 cm de diâmetro na perna direita na parte anterior da canela. O diagnóstico foi confirmado por meio da IDRM (reação de 6 mm de diâmetro), PDL com média de 20 amastigotas/100 campos, PCR-kDNA positivo e caracterizada como *Leishmania (L) amazonensis* na RFLP. A cultura em meio bifásico e a inoculação foi negativa em ocasiões de coleta. Nesta localidade não foi encontrado as principais espécies vetorais incriminadas na transmissão desta *Leishmania* (*Lu. flaviscutellata*, *Lu. olmeca olmeca* e *Lu. reducta*). Contudo, Nieves e Pimenta (2000), infectou experimentalmente a *Leishmania (L) amazonensis* em *Lu. migonei*. Flebotomíneo que foi encontrado no peridomicílio, a uns seis metros da residência onde dormia o paciente com LTA, não descartando a possibilidade de infecção por este díptero, pois ele é o inseto com alta capacidade de adaptação a ambientes antrópicos e podem fazer hematofagia no homem. Este díptero na ausência de sua fonte de alimentação silvestre pode se alimentar de roedores sinantrópicos e em épocas de período chuvoso invadir a habitação humana, alimentar de animais e, secundariamente, do homem (RANGEL; LAINSON, 2003).

A fauna flebotomínica observada no município de Guajará-Mirim foi a mais diversificada do estudo e, também, a que apresentou o maior número de espécies incriminadas na transmissão da LTA. Neste município a espécie predominante foi a espécie *Lu. antunesi*, seguidas de *Lu. sherlocki*, *Lu. ubiquitalis*, *Lu. chagasi*. Além disso, dez espécies foram

encontradas nas áreas estudadas e pelo menos 6 espécies comprovadamente transmissoras de LTA em humanos. Dentre as três áreas analisadas **GM3** deve ter uma atenção especial, pois, foi a localidade que capturou o maior número de espécies e apresentou maior quantidade de espécimes incriminados na transmissão da *Leishmania* (14 espécies). Destas, seis espécies (*Lu. antunesi*, *Lu. ubiquitalis*, *Lu. chagasi*, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. umbratilis* e *Lu. davisi*) representaram quase 78% da fauna capturada. Estes dípteros, com exceção de *Lu. flaviscutellata* e *Lu. davisi*, foram pegos em abrigos de animais e no peridomicílio. Adicionalmente, foi comprovada a infecção de pelo menos um indivíduo com leishmaniose nesta área, sendo o agente causador desta enfermidade a *Leishmania (L) amazonensis*. Como descrito anteriormente, o paciente apresentou uma LCD, com lesões nodulares. E, na avaliação epidemiológica, verificou-se que a possível área de infecção foi justamente nas proximidades de sua residência. Na beira da mata atrás do terreno da chácara e adentrando na floresta uns 150 metros até um local denominado de espera, foram capturados alguns espécimes de *Lu. flaviscutellata*, principal espécie vetora da *L. (L) amazonensis*. Este díptero foi o quarto flebótomo mais encontrado, mesmo sem a utilização de armadilha de Disney. Outros vetores incriminados na infecção deste protozoário foram averiguados, mas sem sucesso. Por isto, a principal suspeita seja que o *Lu. flaviscutellata* tenha sido o responsável por transmitir a leishmania ao paciente. Outro dado importante foram os pontos de captura deste vetor. Os flebótomos foram capturados em áreas de ambiente florestal, principalmente aonde o indivíduo pescava e caçava habitualmente (beira da mata próximo ao igarapé e dentro da mata na “espera”).

Candeias do Jamari foi o terceiro município onde se realizaram as coletas dos flebótomos. Na área estudada, **CJ1**, observou-se a predominância de três espécies, dentre os quais duas são potenciais vetores transmissores de *Leishmania* (*Lu. antunesi*, *Lu. umbratilis*). Esta área se diferencia das outras avaliadas no estudo, em virtude de esta, situar-se o mais próximo do centro da cidade e próximo a margem do Rio Candeias. Foi a localidade com maior identificação de casos de LTA no estudo em uma residência (dois) e com a maioria dos flebótomos encontrados no peridomicílio da residência. Em relação aos pacientes, todos eram do gênero feminino, ambos apresentaram lesões únicas na perna direita e com positividade no parasitológico e PCR-ITS-1. O cultivo e inoculação foram negativos, o RFLP e sequenciamento genômico foram inconclusivos. Além disso, os relatos da família dos pacientes mostram que estes não haviam se retirado da cidade ou indo para locais que poderiam ser fontes de contaminação nos últimos seis meses. Adicionalmente, com o histórico da lesão, descobriu-se que elas não eram superiores a dois meses, sendo mais recente

na criança. Aliado a isto a casa de residência desta família tinha um pequeno quintal que finalizava em um declive acentuado, aonde eram despejados entulhos e restos de alimento. Curiosamente, na primeira semana de coleta, observou-se que os maiores números de flebótomos capturados foram justamente na armadilha instalada nesta região (mais de 50 espécimes capturados em uma única armadilha). E, ao realizar entrevistas com os habitantes desta área, foi identificada a circulação de animais silvestres como gambás (*Didelphis marsupialis*), bicho preguiça (*Choloepus didactylus*) e primatas que são as principais fontes alimentares das espécies mais capturadas. A presença de matéria orgânica, aliada a circulação de animais silvestres na região, que podem adentrar em áreas peri-urbanas, invadindo casas para buscar alimentos nas lixeiras, pode ter contribuído para instalação do ciclo de transmissão da LTA nestas regiões. Aliado a isto o *Lu. antunesi* tem sido descrito como espécie de alta capacidade de adaptação a ambientes antrópicos em áreas de florestas invadidas pelo homem e é altamente antropofílica (VASQUEZ-TRUJILLO et al, 2008). Semelhantemente, a *Lu. umbratilis* já foi encontrada no peridomicílio em parede externa das residências e em abrigos animais. É uma espécie altamente antropofílica, podendo fazer hematofagia nas primeiras horas do dia quando o homem adentra na floresta (YOUNG; DUCAN, 1994; RANGEL; LAINSON, 2003). As duas espécies de flebótomos já foram identificadas infectadas com espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* (FILHO et al, 2001; SILVA-NUNES et al., 2008; VASQUEZ-TRUJILLO et al., 2008), sendo que a *Lu. umbratilis* foi encontrada infectada com as espécies *L. (V) braziliensis* e *L. (V) guyanensis* (RYAN et al, 1987; YOUNG; DUCAN, 1994; RANGEL; LAINSON, 2003; AZEVEDO et al, 2008), sendo deste último é considerado seu vetor principal (RANGEL; LAINSON, 2009). Ao passo que o *Lu. antunesi* é considerado vetor transmissor da *L. (V) lindeberg* (SILVEIRA et al, 2002).

No tocante a distribuição dos flebotomíneos de importância a saúde públicas nas áreas estudadas, observou-se que o vetor *Lu. antunesi* foi a espécie com maior representatividade na fauna entomológica, sendo encontrada durante todo o período das atividades em todas as seis localidades do estudo. Este díptero estava presente em todos os ambientes aonde as armadilhas CDC foram colocadas (floresta primária, bananal, peridomicílio e abrigos animais), demonstrando a sua capacidade de adaptação a ambientes antrópicos e a hábitos alimentares, como mencionada na literatura (RANGEL; LAINSON, 2003). Os trabalhos mais recentes de identificação da fauna, foram executados por Silva em 2010, na Capital Porto Velho, Gil et al., em 2003 e 2009 e Teles et al., 2013. Na Pesquisa de Silva (2010), foram identificadas 27 espécies diferentes utilizando armadilhas tipo CDC, com presença de oito

espécies com potencial de transmitir LTA. Diferente do visualizado em nosso experimento nesta localidade (apenas quatro). No estudo de Gil et al (2009), conseguiu identificar quase 6000 exemplares, sendo o *L. whitmani* e *L. davis* as espécies com o maior número de identificações. Entretanto, apesar de ter conseguido dados importantes que demonstram as espécies circulantes no Estado, estas informações não esclarecem a distribuição do vetor por município de coleta. Teles et al (2013), avaliou a fauna flebotomínica em floresta residual próximas a casos humanos da LTA no município de Monte Negro, detectando 53 espécies de flebotomíneos, tendo as espécies *L. acanthopharynx*, *L. whitmani*, *L. geniculata* e *L. davis* representando aproximadamente 60% dos espécimes capturados.

O *Lu. ubiquitalis*, a terceira espécie mais encontrada no estudo, estava distribuída em todas as áreas dos três municípios coletados. É considerada uma espécie pouco antropofílica e de hábitos silvestres (RANGEL; LAINSON, 2003). Entretanto, no estudo, esta espécie foi capturada no peridomicílio e galinheiros tanto no município de Guajará-Mirim como no de Candeias do Jamari. Os nossos achados corroboram com os dados de Feitosa e Castellón (2004), onde em uma das áreas de seu estudo encontraram o *Lu. ubiquitalis* no peri e intradomicílio, mas diferiram de Barbosa et al (2008) que o encontram apenas na mata. Além disso, foi nesta espécie que se isolou a *L (V) lainsoni* (SILVEIRA et al., 1991a; LAINSON et al., 1992).

A quarta espécie mais prevalente do presente estudo foi *Lu. chagasi*, sendo a oitava mais prevalente nos municípios de Porto Velho e Candeias do Jamari e, a quarta em Guajará Mirim (não identificada no **GM1**). Este díptero já foi capturado infectado com espécie de *Leishmania* do complexo *braziliensis* (RYAN et al., 1987). Habita floresta primária e raramente é encontrada nas residências humanas apesar de ser antropofílica.

O *Lu. davis* e *Lu. flaviscutellata* foram as duas espécies de importância médica, que apresentaram números expressivos de dípteros capturados. O *Lu. davis*, em nosso estudo, foi encontrado predominantemente na mata, com alguns espécimes capturados no peridomicílio de Candeias e Guajará Mirim. Carvalho et al (2010) detectou a capacidade eclética desse flebótomo, sendo capaz de adentrar em ambientes humanos como domicílios ou abrigos animais (canis, chiqueiro, e galinheiro).

Azevedo et al (1993) encontrou este díptero na estação ecológica da Usina hidrelétrica de Samuel. Já Gil et al, (2003) demonstrou que esta espécie é abundante na parte central do Estado. Em 2009, este mesmo autor identificou este espécime em material de 1997 coletados em oito áreas de estudo no estado de Rondônia. No trabalho Teles et al (2013), foi a quarta espécie mais abundante da fauna flebotomínica pesquisada no município de Monte

Negro/RO. Na literatura, o *Lu. davis* é considerado um dos vetores transmissores da *Leishmania (V) braziliensis*. Grimaldi et al., 1991, conseguiu isolar este protozoário em *Lu. davis* capturados no estado Rondônia. Souza et al (2010), mais recentemente no Pará conseguiram isolar, neste díptero, a *Leishmania (V) braziliensis*. Além disso, Grimaldi et al (1991) incriminaram este flebótomo na transmissão da *Leishmania (V) naiffi*, reforçando a capacidade vetorial deste flebótomo na transmissão das leishmanias na região amazônica.

O *Lu. flaviscutellata*, apesar de ser apenas a oitava espécie mais capturada no estudo, ganha importância epidemiológica, pois é a responsável pela transmissão de uma espécie de *Leishmania* que causa uma forma clínica de difícil tratamento, a LCD. No estudo, o flebotomíneo foi encontrado quase que na totalidade no interior da mata e uma pequena quantidade na entrada da mata, em especial, na área onde se identificou o caso de LCD. Quando se comparou os dados da literatura com os nossos, verificou-se que são semelhantes aos achados de Azevedo et al. (1993), Gil et al (2003 e 2009) e Teles et al (2013). Porém, diferem dos resultados de Ready et al (1983), que capturou, usando armadilha de Disney, grande número desta espécie em áreas de plantio de pinhais nativos, próximo a florestas. Este autor faz referência a uma possível adaptação do *Lu. flaviscutellata* em ambientes onde não há a presença de sua fonte primária de alimento preferindo picar o homem na ausência de animais silvestres (roedores). O díptero é considerado o principal vetor da *Leishmania (L) amazonensis*. E, Lainson, Ryan e Shaw (1987) conseguiram isolar e descrever os estágios deste protozoário no vetor. Em nosso estudo duas áreas (**PVH1** e **GM3**) apresentaram pacientes com LTA causados por *L. (L) amazonensis* (descrito com detalhes anteriormente).

Em nosso estudo foi observado heterogeneidade na fauna flebotomínica em todas as áreas estudadas. Esta heterogeneidade possivelmente ocorreu por causa das características inerentes de cada localidade avaliadas, assim como também, a fonte de alimentação e a capacidade de adaptação destes vetores. Em locais onde se observaram a presença de animais domésticos houve maior concentração de espécimes no peridomicílio com hábitos zoofílicos e antropofílicos adentrando nestes abrigos animais, como observado em **GM1**, **GM3** e **CJ1**. Também foi observada uma quantidade abundante de flebótomos no peridomicílio da residência aonde ocorreram os casos de LTA em **CJ1**. Em **PVH1** observou-se um caso de LTA causada por *L. (L) amazonensis* sem a detecção da presença de algum vetor transmissor incriminado para esta espécie, sendo sugerido que o *Lu. migonei* o vetor mais provável pela infecção. Esta hipótese foi levantada em vista deste díptero ter sido artificialmente contaminado por este protozoário. Com estas indagações, aliado as condições favoráveis observadas nestas localidades (presença de acúmulo de folhas e entulhos ao redor ds

residências, presença de fonte alimentar) e ao potencial de adaptação a ambiente antrópico descrito na literatura por alguns flebótomos (FEITOSA; CASTELLÓN, 2004; VASQUEZ-TRUJILLO et al., 2008; CARVALHO et al., 2010), inferiu-se que ao menos cinco espécies de flebotomíneos (*Lu. antunesi*, *Lu. umbratilis*, *Lu. davisi*, *Lu. ubiquitalis* e *Lu. migonei*) poderiam se adaptar ao ambiente das áreas estudadas. Esta mudança no hábito alimentar advém da invasão do homem a floresta primária. Com a destruição dos abrigos dos animais e consequente desaparecimento destes animais, que serviam de fonte de alimento para os flebotomíneos, forçam a estes vetores a realizar hematofagia nos animais domésticos, podendo, posteriormente, invadir as residências atacando o ser humano. Exemplo disto foi o caso de leishmaniose na cidade de Candeias do Jamari, onde uma criança adquiriu leishmaniose no quintal de sua residência que é fronteira com a mata. Outro exemplo é o que vem acontecendo no Município de Manaus, onde residências próximas a matas residuais, apresentaram mais de uma espécie vetora habitando o intradomicílio, que historicamente eram capturadas somente no ambiente silvestre (FEITOSA; CASTELLÓN, 2004). Recentemente Teles et al (2013), observou a presença de espécies de flebotomíneos incriminados na transmissão de LTA em áreas de matas residuais próximos a áreas de ocorrência de casos da enfermidade.

Diante do que foi exposto, verificou-se que há necessidade de se conhecer melhor a ecoepidemiologia da LTA em Rondônia. Os dados obtidos no estudo demonstraram a complexidade da enfermidade, com observação de nichos ecológicos com características, que poderiam refletir em um ciclo de transmissão diferente, como ocorreu nas três áreas que foram identificados casos de LTA humana. Além disso, o aprimoramento do diagnóstico desta enfermidade é essencial, com a utilização de técnicas, como PCR-kDNA, no laboratório de média e alta complexidade (LACEN) que já seria uma ferramenta não apenas de diagnóstico, mas também como instrumento de auxílio no controle de qualidade e consequentemente na vigilância desta enfermidade no Estado.

8. CONCLUSÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana, no estudo, acometeu, predominantemente, homens em idade produtiva com escolaridade de até oito anos de estudo e que desempenhavam alguma atividade agropecuarista ou de lazer.

A PCR-kDNA foi o melhor sistema de PCR e o segundo melhor método de diagnóstico na detecção de *Leishmania*, sendo menor apenas que o parasitológico direto em lâmina. Ao passo que a PCR-RFLP do ITS-1, juntamente com o sequenciamento genômico foram capazes de identificar as espécies *L. (V) braziliensis*, *L. (L) amazonensis*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V) lainsoni* e *L. (V) Naiffi* nos materiais obtidos dos esfregaços de lâmina de pacientes com LTA encaminhados a seis unidades de saúde do Estado.

Das espécies identificadas a *L. (V.) braziliensis* foi a espécie prevalente no estudo, sendo encontrada em amostras de pacientes em oito municípios do estado;

A fauna flebotomínica das áreas avaliadas no estudo mostrou-se bastante diversificada, identificando nestas, em especial no periodomicílio e ambiente antrópico, pelo menos seis espécies incriminadas na transmissão da LTA em humanos. E dentre os flebótomos o *Lutzomyia antunesi* foi a espécie predominante nas localidades onde foram realizadas estas coletas, demonstrando área potenciais de transmissão de pelo menos três espécies de *Leishmania*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V) guyanensis* e *L. (L) amazonensis*.

9. REFERENCIAS

AKHAVAN, A. A., et al. *Leishmania* species: Detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. **Exp Parasitol.** 126 (4), p. 552–556, 2010.

ALAM, M.Z. et al. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. **Tropical Medicine International Health**, 14 (5), p. 499-503, 2009.

ALCÂNTARA, A. C. **ELISA indireto e mkDNA PCR-RFLP para o diagnóstico e avaliação da infecção por *Leishmania* sp. Em reservatórios domésticos (cães) e silvestres (marsupiais) em Barrado Pojuca, Camaçari, Bahia.** 2006. 126f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos). Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J. et al. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós colombianas. História, **Ciências e Saúde**, Rio de Janeiro, Manguinhos: 10, p. 853-882, 2003.

AMATO, V.S. et al. Immunohistochemistry and polymerase chain reaction on paraffin imbedded material improve the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the Amazon region. **Int. J. Dermatol.**, 48, p. 1091-1095, 2009.

AMPUERO, J. et al. Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localised cutaneous leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 104(7): 992-997, 2009.

ANDRADE, A. J.; DANTAS-TORRES, F. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) of the State of Minas Gerais, Brazil. **Neotropical Entomology**, 39(1), p. 115-123, 2010.

ANDRADE, A.J. **Ecologia química de Flebotomíneos (díptera: *Psychodidae*: *Phlebotominae*): Desenvolvimento de uma armadilha e análise dos hidrocarbonetos cuticulares das espécies.** 2010. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2010.

ANDRADE, B. B. et al. Role of Sand Fly Saliva in Human and Experimental Leishmaniasis: Current Insights. **Scandinavian Journal of Immunology**, 66, p. 122–127, 2007.

ANDRADE-FILHO, J.D. et al. Flebotomíneos do Estado de Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). **Rev Soc Bras Med Tropical** 34(4), p. 323-329, 2001.

AVILES, H. et al. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. **J Parasitol**, 85, p. 181–187, 1999.

AZEVEDO, A.C.R. et al. Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American Cutaneous Leishmaniasis in state of Acre, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 103(8), p. 760-767, 2008.

AZEVEDO, A.C.R et al. Studies on the sandfly fauna of Samuel Ecological Station Porto Velho municipality, Rondônia state, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 88, p. 509-512, 1993.

BACHA, H.A. **Identificação molecular das species de leishmânia em lesões cutâneas de pacientes atendidos no Centro de Controle de Zoonoses de Santarém, Pará**. 2009. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BARBOSA, M.G.V. et al. Fauna de flebotomíneos (Diptera: *Psychodidae*) em um foco de leishmaniose tegumentar americana na área periurbana de Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41(5), p. 485-491, 2008.

BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence *that Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am J Trop Med Hyg.** 44, p. 536–546, 1999.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Aspectos imunológicos da leishmaniose cutânea difusa (LCD). **Gaz. méd. Bahia**, 79 (Supl.3), p. 35-39, 2009.

BARRAL, A.; COSTA, J. *Leishmanias e a Leishmanioses Tegumentar nas Américas*. 1ª edição, Rio de Janeiro, ed. **Gráfica Contexto**, 2011, 248p.

BASANO, S.A; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.** vol. 7, Nº 3, p. 328-337, 2004.

BATES, P.A. Housekeeping by *Leishmania*. **Trends Parasitol**, 22, p. 447–448. 2006.

BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, 37, p. 1097–1106, 2007.

BENSOUSSAN, E. et al. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol**, p. 1435–1439, 2006.

BHATTARAI, N.R et al. PCR and direct agglutination as *Leishmania* infection markers among healthy Nepalese subjects living in areas endemic for Kala-Azar. **Tropical Medicine and International Health**, 14(4), p. 404-411, 2009.

BITTENCOURT, A.L. Aspectos histopatológicos e ultra-estruturais da leishmaniose cutânea difusa (LCD). **Gaz. Méd. Bahia**, 79 (Supl.3), p. 45-51, 2009.

BRAGA-MIRANDA, L.C.; MIRANDA, M. GALATI, E.A.B. Phlebotomine fauna in a rural area of the Brazilian Pantanal. **Rev Saúde Pública**, 40(2), p. 324-326, 2006.

BRAZIL, R.P.; BRAZIL, B.G. Biologia de Flebotomíneos Neotrópicos. In Rangel E F, Lainson R (eds) **Flebotomíneos do Brasil**, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003. p. 257-274

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose tegumentar Americana**. Brasília, 2007a, 181p.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana diagnóstico clínico e diferencial**. Brasília, 2007b, 137p.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Tegumentar Americana, Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2010. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2010**. [citado 2012 jan. 30]. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1560 (acessado em 30 de janeiro de 2012)

BRITO, M.E.F. et al. Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, 14:(10), p. 1278–1286, 2009.

BROCK, T. D.; FREEZE, H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile. **Journal of Bacteriology**, p. 289-297, 1969.

BRÜCKER, G.; GENTILINI, M. Las Leishmaniasis en América Latina. **La Fondation Rhône-Poulenc Santé**, Paris, p. 30, 1987.

BRUSTOLONI, Y.M. et al. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 102(4), p.1-4, 2007.

BRYCESON, A .D.M., Leishmaniasis. In Cook, G.C. (Ed), **Manson tropical diseases**, W B Saunders, London, p.1213-1245. 1996.

CAMARGO, E.P. Doenças tropicais, **Estudos Avançados**, 22 (64), p. 97-110, 2008.

CARVALHO, E.M, et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, 56, p. 315-25, 1994.

CARVALHO, S.M.S. et al., Situação da Leishmaniose Tegumentar Americana na área urbana de Ilhéus, BA. **NewsLab**, ed. 103, p. 104-106, 2010.

CASTILHO, T.M.; SHAW, J.J.; FLOETER-WINTER, L.M. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **Journal of Clinical Microbiology**, 41, 540–546. 2003.

CASTRO, EA, et al . Epidemiological and clinical study of 332 cases of cutaneous Leishmaniasis in the north of Parana State from 1993 to 1998. **Rev Soc Bras Med Trop**. 35:445-52, 2002.

CAVALCANTI, D. P. et al. The kinetoplast ultrastructural organization of endosymbiont-bearing trypanosomatids as revealed by deep etching, cytochemical and immunocytochemical analysis. **Histochem Cell Biol**, 130, p. 1177-1185. 2008.

CHAVES, R.C.G. **Estudo epidemiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado do Amapá estratificado em regiões de risco no Período de 2002 a 2006**. 2007. 74f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Belém, 2007.

CIPA Group [homepage on the internet]. Paris: Computer-aided identification of phlebotomine sandflies of America. Site hosted by Université Pierre et Marie Curie [updated 1999]. Available from: <http://cipa.snv.jussieu.fr/>. (acesso 28/01/2013).

COELHO, L.I.A.R.C. **Caracterização de *Leishmania* spp. Em Amostras Isoladas de Pacientes Portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana em Área Endêmica da Região Norte, Brasil**. 2010. 128 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

COELHO, L.I.C et al. Characterization of *Leishmania spp.* causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, **Brazil Parasitol Res**, 108, p. 671–677, 2011.

COLLA-JACQUES, F. E.; CASANOVA, C.; PRADO, A.P. Study of sand fly fauna in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis and canine visceral leishmaniasis in the municipality of Espírito Santo do Pinhal, São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 105(2), p.208-215, 2010.

CORREA, E.A. **Aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais da Leishmaniose Tegumentar Americana nos subespaços 07 e 08 no estado de Rondônia**. 2007. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Brasília, Distrito Federal, 2007.

CORRÊA, N. A. B. et al. Levantamento soroepidemiológico da Leishmaniose tegumentar e doença de chagas em uma comunidade rural da região sul do Estado do Mato Grosso do Sul - Brasil. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, v. 15, n. 1, p. 23-28, 2011.

CÔRTEZ, D.F. **Infecções com baixas doses de *Leishmania amazonensis*: um modelo para o estudo de leishmaniose tegumentar americana**. 2008. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências), Belo Horizonte, 2008.

COSTA, J.M.L et al. Leishmaniose Cutânea Difusa no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. **Gazeta médica da Bahia**. 79 (Supl.3):16-24, 2009.

COSTA, J.M.L. Estudo da Leishmaniose Cutânea Difusa no Estado do Maranhão, Brasil: avaliação terapêutica e correlação do perfil imunológico entre pacientes e seus familiares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 31(4), p. 401-403, jul-ago, 1998.

CROWTHER, J.R. The ELISA Guidebook: **Theory and practice**. 2ª Edição. New Jersey: Humana Press, Jan 2001. 426p. (Série Methods in Molecular Biology , v. 149).

CRUZ, M.F.R. **Estudo Epidemiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), no município de Itambaracá, Região Norte do Estado do Paraná, Brasil, em áreas de influência do complexo hidroelétrico na bacia do Rio Paranapanema, 2004 a 2006**. 2008.168f. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CUBA, C. A. C. Diagnostico parasitologico de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana. **Rev Med Exp**, 17, p. 1-4, 2000.

CUBA, C.A. C et al. El cultivo ``in vitro`` como instrumento practico para el diagnostico y aislamiento primário de *Leishmania braziliensis braziliensis*. 2 estudos en pacientes de areas endemicas. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 28, p.317-24, 1986.

CUNHA, S. R. P. A hidreletrica de Jirau e seus impactos no Estado de Rondônia. **T & C Amazônia**. Ano 6, n.14, p.91-99, 2008.

CUPOLILLO, E. et al. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, p. 142-144, 2000.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JR, G; MOMEN, H. A general classification of the New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 50, p. 296-311, 1994.

CURTI, M.C.M. et al. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana na região Noroeste do Estado do Paraná. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** 30(1), p.63-68, 2009.

D'ÁVILA, S. C.G.P. et al. Estudo retrospectivo dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana diagnosticados no laboratório de patologia do Hospital de Base da FAMERP nos anos de 1995-2000, com enfoque clínico e anatomopatológico. **Arq Ciênc Saúde**, 11(2), p. 2-5, 2004.

DAVIES, C.R. et al. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **BMJ**, 326, p. 377-82, 2003.

DENIAU, M. et al. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 97(1), p. 15-33, 2003.

DESJEUX P. *Leishmania* and HIV in gridlock. Geneva: World Health Organization [Joint WHO and United Nations Program on HIV/AIDS (UNAIDS)], 1998.

DINIZ, J. L. C. P.; COSTA, M. O. R.; GONÇALVES, D. U. Mucocutaneous Leishmaniasis: clinical markers in presumptive diagnosis. **Braz J Otorhinolaryngol**, 77(3), p. 380-384, 2011.

DISCH, J. et al. *Leishmania* (*Viannia*) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 51, p.185-190, 2005.

DORVAL, M.E.M.C. et al. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Rev Soc. Bras. de Med. Trop**, 39(1), p.43-46, 2006.

DUARTE, M. L.; ROCHAEL, M. C. Perfil histopatológico e imuno-histoquímico da leishmaniose tegumentar americana com ênfase nos dendrócitos dérmicos FXIIIa+. **An Bras Dermatol**, 81(6), p. 541-548, 2006.

ELTAI, N.O. et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene**, 94, p. 575-579, 2000.

FEITOSA, M.A.C.; CASTELLÓN, E.G. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos florestais ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. II. Estratificação horizontal. **Acta. Amazonia**. V. 34(1), p. 121 – 127, 2004.

FELICIANGELLI, M.D. Natural breending places of Phlebotomine sandflies. **Med. Vet. Entomol**, v.18, p.71-80, 2004.

FERNANDES, O. et al. Minicircle variable region probes for characterization of *Leishmania (Viannia)* species. **The Journal of Parasitology**, 85, p. 563-568, 1999.

FIGUEIRA, L.P. et al. Caracterização isoenzimática de isolados humanos de *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41(5), p. 512-514, 2008.

FILHO, J.D.A. et al. Flebotomíneos do Estado de Tocantins, Brasil (Diptera: *Psychodidae*). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, 34(4), p. 323-329, 2001.

FORATTINI, O. P. *Psychodidae, Phlebotominae, Leishmanioses, Bartonelose*. In: Edgard Blücher. **Entomologia Médica**, São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo, v. 4, 1973.

FRAGA, T.L. et al. Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 105(3), p. 310-313, 2010.

FRANÇA, E.L. et al. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Juína, Mato Grosso, Brasil. **Scientia Medica**, 19(3), p. 103-107, 2009.

FURTADO T. Critérios para diagnóstico de LTA. **Anais Brasileiros de Dermatologia** 65, p. 51-86, 1980.

GALATI, E A B. Classificação de Phlebotominae, p. 23-51. In Rangel E F, Lainson R (eds) **Flebotomíneos do Brasil**, Fiocruz, Rio de Janeiro, 367p. 2003.

GARCIA, FCB; et al. Métodos subsidiários para o diagnóstico da Leishmaniose tegumentar americana (LTA): comparação dos resultados do sequenciamento de DNA e da PCR-RFLP para determinação da espécie de *Leishmania* em amostras cutâneo-mucosas. **An Brás Dermatol**, 80(supl 3), p. 339-344, 2005.

GARCIA, L et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. **Journal of Clinical Microbiology**, 42(5), p. 2294-2297, 2004.

GARCÍA-ALMAGRO, D. Leishmaniasis cutânea. **Actas Dermosifiliogr**, 96(1), p.1-24, 2005.

GIL, L.H.S. et al . Species structure of sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in the Brazilian western Amazon. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 104(7), p. 955-959, 2009.

GIL, L.H.S. et al. Recent Observations on the Sand Fly (Diptera: *Psychodidae*) Fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the Importance of *Psychodopygus davisi* as a Vector of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 98(6), p. 751-755. 2003.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 36(1), p.71-80, 2003.

GONTIJO, C.M.; MELO, M.N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Rev. Bras. Epidemiol.** 7(3), p. 338-49, 2004.

GRAÇA, G.C. **Desenvolvimento e avaliação comparativa de metodologias baseadas na pcr para o diagnóstico molecular e identificação específica de agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar que circulam em áreas endêmicas brasileiras**. 2011. 106 f. Mestrado. (Dissertação de Mestrado em Medicina Tropical). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

GRAÇA, G.C. et al. Development and validation of PCR-based assay for diagnosis of American cutaneous Leishmaniasis and identification of the parasite species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 107(50), p. 664-674, 2012.

GREVELINK, S.A.; LERNER, E.A. Leishmaniasis. **J Am Acad Dermatol**, 34, p. 257-272. 1996.

GRIMALDI JR G, et al. Characterization and Classification of Leishmanial Parasites From Humans, Wild Mammals, and sand flies in the Amazon Region of Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, 44, p. 645-661, 1991.

GRIMALDI, G.; TESH, J.R.B; McMAHON-PRATT, D. A Review of the Geographic Distribution and Epidemiology of Leishmaniasis in The New World. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 41(6), p. 68-725, 1989.

GRISARD, E.C. et al. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. **Acta Tropica**, 74, p. 89–93, 2000.

GUERRA, J.A.O. et al. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS Negl Trop Dis**, 5(3), p. 1-5, 2011.

GUEVARA P, et al. *Leishmania braziliensis* in blood 30 years after cure. **Lancet**. 341, p. 1341, 1993.

GUEVARA, P. et al. Presence of *Leishmania braziliensis* in Blood Samples from Cured Patients or at Different Stages of Immunotherapy. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 1(4), p. 385-389, 1994.

GUIMARÃES, L.H, et al. Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar. **Gaz. méd. Bahia**, 75:1(Jan-Jun), p.66-74, 2005.

GUIMARÃES, V. C. F. V. **Avaliação da infecção natural de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) por Leishmania spp. no Município de São Vicente Férrer, Pernambuco.** 2011. 79 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

HARRIS , E. et al. Single-Step Multiplex PCR Assay for Characterization of New World *Leishmania* Complexes. **J. Clin. Microbiol**, 36(7), p. 1989, 1998.

HERWALDT, B. L. "Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures," **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 14, no. 4, p. 659–688, 2001.

JACOBSON, R. L, et al. Outbreak of Cutaneous Leishmaniasis in Northern Israel. **The Journal of Infectious Diseases**, 188, p. 1065–1073, 2003.

Jl, J.; SUN, J.; Ql, H.; SOONG, L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, v. 66, n. 4, p. 338-345, 2002

Jl, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4278-4288, 2003.

JONES, T.C et al. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Journal of Infectious Diseases** 156, p. 73-83, 1987.

KAZEMI-RAD, E. et al. Diagnosis and characterization of *Leishmania* species in giemsa-stained slides by PCR-RFLP. **Iranian Journal of Public Health**, 37(1), p. 54-60, 2008.

KILLICK-KENDRICK R. The biology and control of phlebotomine sandflies. **Clin Dermatol**, 17, p. 279–289, 1999.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990.

KNIO, K., et al. Isoenzyme characterization of *Leishmania* isolates from Lebanon and Syria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 63(1, 2), p. 43–47, 2000.

LAINSON, R et al. *Leishmania (Viannia) shawi* sp.n, a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. **Ann Parasit Hum Comp**, 64, p. 200-207, 1989.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Rev Pan-Amaz Saude**, 1(2), p. 13-32, 2010.

LAINSON, R. et al. A *Leishmania* e as leishmanioses. In: **instituto Evandro Chagas; 50 anos de contribuição às ciências biológicas e á medicina tropical**. Belém. Fundação Serviços de Saúde Pública, v.1, p. 83-124, 1986.

LAINSON, R. et al., Further observations on *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: *Phlebotominae*), the sandfly vector of *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz**, vol. 87(3), p. 437-439, 1992.

LAINSON, R.; RYAN, L; SHAW, J.J. Infective stages of *Leishmania* in the vector and some observations on the mechanism of transmission. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz**, Vol. 82(3), p. 421-424, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological Sciences**, London, v. 321, p. 389-404, 1988.

LAINSON, R.; WARD, R.D.; SHAW, J.J. Cutaneous leishmaniasis in North Brazil: *Lutzomyia anduzei* as a major vector. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 70, p. 171-172, 1976.

LEMIRANI, M. et al. PCR detection of *Leishmania* in skin biopsies. **J Infect Developing Countries**, 3(2), p.115-122. 2009.

LESSA, M.M. et al., Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Rev.Bras. Otorrinolaringol**, 73(6), p. 843-847, 2007.

LEVINE, N.D. et al. A newly revised classification of the PROTOZOA. **Journal of Protozoology**. 27, p. 37-58, 1980.

LEWIS, D.J. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera:Psychodidae). **Bull Br. Mus. Nat. Hist. Entomol.** v. 45, p. 121-209, 1982.

LIMA JUNIOR, M.S.C et al. Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. **Rev Soc. Bras. Med. Trop**, 42(3), p. 303-308, 2009.

LIMA, A. C. V. M. R. **Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Vianna, 1911 de Diferentes Regiões do Brasil**. 2010a. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010a.

LIMA, A.C.S **Diagnóstico Molecular de Leishmaniose Tegumentar: Identificação de espécies de *Leishmania* por SSUrDNA PCR e G6PD PCR**. 2010b. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010b.

LIMA, E.B. et al. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **An Bras Dermatol.** 82(2), p. 111-124. 2007.

LINDOSO, J.A.L; LINDOSO, A.A.B.P. Neglected Tropical Diseases in Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.** 51(5), p. 247-253, 2009.

MAGALHÃES, S.C.G. **Estudo dos Impactos sociais e ambientais decorrentes dos projetos hidrelétricos de Jirau e Santo Antônio - Reflexões preliminares.** Porto Velho – RO: Universidade Federal de Rondônia-UNIR, 2006.

MARCOS, M.I.P.D. **Análise da diversidade genética de *Leishmania* em isolados caninos da Região do Alto Douro.** Vila Real: Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro, p.58, 2009.

MARTINS, L.; ALEXANDRINO, A.; GUIMARÃES, G. Detecção de DNA de *Leishmania braziliensis* em pacientes de Leishmaniose Tegumentar Americana. **Rev. Saúde Pública,** 44(3), p. 1-4, 2010.

MARY, C. et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology,** p. 5249–5255, Nov. 2004.

MARZOCHI, M.C.A; SHUBACH, A.O; MARZOCHI. Leishmaniose tegumentar americana. In.: CIMERMAN.B & CIMERMAN.S. **Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais.** Ed. Atheneu, cap.09, 1999, p.39-64.

MATEUS R.P et al. Caracterização preliminar do espaçador interno transcrito-1 (ITS-1) do DNA ribossômico nas espécies do Cluster buzzatii de *Drosophila* (Diptera: *Drosophilidae*). **Ambiência,** Guarapuava, 2(1), p. 89-96, 2006.

MELLO, C.X. **Otimização do preparo de meio de cultura Schneider® para o isolamento de *Leishmania sp.*** 2009. 66 f. Monografia (Especialização em Vigilância Sanitária). Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2009.

MENDONÇA M.G, et al. . Persistence of *Leishmania* Parasites in Scars After Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There Sterile Cure? **J Infect Dis,** 189, p. 1018-1023, 2004.

MEYER, T.N.; SILVA, A.L. Resposta celular ao estresse. **Rev Ass Med Brasil.** 45(2)p. 181-188, 1999.

MIRANDA, T.M. et al. Descriptive study of American tegumentary leishmaniasis in the urban area of the Municipality of Governador Valadares, Minas Gerais State, Brazil. **Rev Pan-Amaz Saude**, 2(1), p. 27-35, 2011.

MOLINA, A.L.; TOBO, P.R. Série - Biologia molecular Atualização. Parte 2 - Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **einstein**. 2(2), p. 139, 2004.

MORAES, M.A.P.; SILVEIRA, F.T. Histopatologia da forma localizada de Leishmaniose Cutânea por *Leishmania (Leishmania) Amazonensis*. **Rev Inst.Med. Trop. São Paulo**, 36(5), p.459-463, 1994.

MOTA, L.A.A.; MIRANDA, R. R. Manifestações dermatológicas e otorrinolaringológicas na Leishmaniose. **Arq. Int. Otorrinolaringol**, v.15, n.3, p. 376-381, 2011.

MOTAZEDIAN, H. et al. DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, Vol. 96, No. 1, p. 31–34, 2002.

NAIFF JÚNIOR, R.D. et al. Estudo de uma série de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. **Rev. Patol. Trop.** 38 (2), p.103-114, 2009.

NAIFF, R.D. et al. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Laison & Shaw, 1989. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol.86(3):317-321, 1991.

NAIFF, R.D.; TALHARI, S.; BARRETT, T.V. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 83, p. 529–530, 1988.

NAME, R. Q. et al. Estudo clínico, epidemiológico e terapêutico de 402 pacientes com leishmaniose tegumentar americana atendidos no Hospital Universitário de Brasília, DF. Brasil. **An Bras Dermatol**. 80(3), p. 249-54, 2005.

NESSER, J.T; DONALISIO, M.R; VASCONCELOS. Distribuição espacial dos casos de leishmaniose tegumentar americana no município de Campinas, Estado de São Paulo, no período de 1992 a 2003. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 42(3), p.309-314, 2009.

NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. São Paulo: Atheneu, 11ª ed. 494p, 2005.

NIEVES, E.; PIMENTA, P.F.P. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae), **J. Med. Entom.**, 37 (1). p. 134-140, 2000.

OLIVEIRA-NETO M.P. et al. An outbreak of american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 83(4). p. 427-35, 1988.

OMS (Organização Mundial de Saúde). Health topics: **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>> Acesso em: 01 de janeiro de 2012.

OURIVES-NEVES L, et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **An Bras Dermatol.** 86(6), p. 1092-101, 2011.

PAJOT, F.X. et al. Epidemiology of leishmaniasis in French Guiana. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 76, p. 112-113, 1982.

PARAGUASSU-CHAVES, C.A. Geografia Médica ou da Saúde (Espaço e doença na Amazônica Ocidental). Rondônia: **Edufro**, 2001.

PASSOS, L.N. **Avaliação em cadeia de polimerase (PCR) no diagnóstico da Leishmaniose tegumentar no Espírito Santo, Brasil.** 2003. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PASSOS, V.M.A. et al. Leishmaniose tegumentar na Região Metropolitana de Belo Horizonte: aspectos clínicos, laboratoriais, terapêuticos e evolutivos (1989-1995). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 34(1), p.5-12, 2001.

PELOSO, E.F. Leishmaniose Tegumentar Americana: **Análise Epidemiológica de pacientes de diferentes regiões de Minas Gerais e caracterização molecular do Gênero *Leishmania*.** 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas). Universidade Federal de Alfenas, Belo Horizonte, 2007.

PESSOA, S.B.; MARTINS, A.V. Leishmanioses tegumentares. In:___ **Parasitologia Médica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, p.78-87.

PESSÔA, SM. **Parasitologia Médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.

PIAZZOLLA, L.P. **Perfil Epidemiológico dos Pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Distrito de Aningas**. 2007. 25f. Monografia (Especialização em Dermatose de Interesse Sanitário). Escola de Saúde Pública Paulo Marcelo Martins Rodrigues, Fortaleza, 2007.

PIRES, M.A.S. et al. Aspectos imunológicos e clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: uma revisão. **Rev. Ciênc. Saúde**, v.14, n.1, p. 30-39, 2012.

PIRES, R.C.R. **Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar (LTA) no município de Paraibano-Maranhão nos anos de 2002 a 2004**. 2005. 42 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da Universidade Federal do Maranhão), São Luiz, 2005.

POURMOHAMMADI, B. et al. Comparison of Three Methods for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. **Iranian J Parasitol**, vol. 5, No.4, p.1-8, 2010.

PUPO, J.A. Leishmaniose tegumentar. Epidemiologia, profilaxia e tratamento da leishmaniose americana. **Ciência Médica**, n4, p. 387-409, 1926.

RAMOS, E.S.M; DE MOURA CASTRO, J. C. Leishmaniasis and other dermatozoonosis in the Brazil. **Clin. Dermatol.**, 122-134, 2002.

RANGEL, E. F. et al. Flebótomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, p. 347-349, 1986.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro, RJ. Editora fiocruz, 2003, 368p.

RANGEL, E.F; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 104(7), p. 937-954, November, 2009.

READY, P.D; LAINSON, R; SHAW, JJ. leishmaniasis in Brazil: XX. Prevalence of "enzootic rodent leishmaniasis" (*Leishmania mexicana amazonensis*), and apparent absence of "pian bois" (*Le. braziliensis guyanensis*), in plantations of introduced tree species and in other non climax forests in eastern Amazônia. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, vol. 77, No. 6, 775-785, 1983.

REIS, L.C. et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Rev Patol Trop.**, 35 (2), p. 103-115, 2006.

REITHIGER R, et al. Cutaneous Leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.** 7(9), p. 581-596, 2007.

REY, L. Dípteros Nematóceros em Geral. Psicodídeos, Simulídeos e Ceratopogonídeos. In: ____ **Parasitologia** 3ª edição Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 56, p. 696-703, 2001.

RODRIGUES, E.H.G. et al. Evaluation of PCR for Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of Endemicity in Northeastern Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, Vol. 40, No. 10, p. 3572–3576, 2002.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, I. et al. Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico, and Spain. **Experimental Parasitology**, 112, p. 44–51, 2006.

ROMERO, G.A, et al. Identification of antigenically distinct populations of *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* from Manaus, Brazil, using monoclonal antibodies. **Acta Tropica**, 82, p. 25–29, 2002a.

ROMERO, G.A, et al. The rarity of infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* among patients from the Manaus region of Amazonas state, Brazil, who have cutaneous leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol**, 96, p. 131–136, 2002b.

RYAN, L. et al, Leishmaniasis in Brazil. XXV. Sandfly vectors of *Leishmania* in Pará State, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, 1, p. 383-395, 1987.

SALDANHA, A.C.R. et al. Cura clinica na Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, 79 (Supl.3), p. 52-61, 2009.

SALOMÓN, O.D. et al. Phlebotominae spatial distribution associated with a focus of tegumentary leishmaniasis in Las Lomitas, Formosa, Argentina, 2002. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 101(3), p. 295-299, 2006.

SAMPAIO, R.N.R. et al., Estudo comparativo de técnicas de demonstração de amastigotas e isolamento de promastigotas no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **An bras Dermatol, Rio de Janeiro**, 77(5), p. 557-561, set./out. 2002.

SAMPAIO, RNR; PAULA, CDR. Leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. *Revista da Sociedade Brasileira de medicina Tropical*. V32, n.5, p.523-528, 1999.

SAMPAIO, R.N.R et al. Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. **Rev Soc Bras Med Trop**. 42(6), p.686-90, 2009.

SARAIVA, N.G. et al. Recurrent lesion in human *Leishmania braziliensis* infection—reactivation or reinfection? **Lancet**. 336, p. 398–402, 1990.

SCHALLIG, H.D.F H., OSKAM, L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Trop Med Int Health**, 7, p. 641-651, 2002.

SCHONIAN, G. et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 47, p. 349-358, 2003.

SCHUBACH A, et al. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. **Am J Trop Med Hyg** 58, p.824-827, 1998.

SHAW, J. J. et al. The aetiological agents of American cutaneous leishmaniasis in the municipality of Monte Negro, Rondônia state, Western Amazonia, Brazil. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, 101 (8), p. 681–688, 2007.

SHAW, J.J.; ISHIKAWA, E.A.Y.; LAINSON, R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 83, p. 783–784, 1989.

SHIMABUKURO, P.H.F.; GALATI, E.A.B. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotrop**, vol. 11, no. 1a, 1-20, 2011

SILVA, A.E.P.; GURGEL, H.C. Leishmaniose tegumentar americana e suas relações sócio ambientais no município de Ubatuba-SP. disponível em :<<http://confins.revues.org/7348>>. Acesso em: 07 Maio 2013.

SILVA, C.L.A. **Levantamento da fauna de flebotomíneos (díptera:Psychodidae) no parque natural municipal de Porto Velho-RO**. 2010. 54 f. Monografia (Licenciatura e

Bacharelado em Ciências Biológicas, com ênfase em Botânica). Curso de Biologia do Centro de Ensino
São Lucas, Porto Velho, 2010.

SILVA, M.A.L, et al. Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose Visceral Humana. **Revista Eletrônica de Farmácia** Vol 7 (3) , p. 01 - 15, 2010a.

SILVA, L.A. et al. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, 10, p. 77–83, 2010b.

SILVA, L.M.R.; CUNHA, P. R. A urbanização da leishmaniose tegumentar americana no município de Campinas – São Paulo (SP) e região: magnitude do problema e desafios. **An Bras Dermatol**, p. 82(6), p. 515-519, 2007.

SILVA, N. S.; MUNIZ, V. D. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Acre, **Amazônia brasileira Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 25(6), p. 1325-1336, jun, 2009.

SILVA, O.V. **Avaliação do Teste de Aglutinação Direta (TAD) no diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)**. 2003. 62 f. Dissertação (Mestrado em saúde Pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife – PE, 2003.

SILVA-NUNES et al., Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar e descrição das populações de flebotomíneos no município de Acrelândia, Acre, Brasil. **Rev Bras Epidemiol.**, 11(2), p. 241-251, 2008.

SILVEIRA, F.T, et al. Cutaneous leishmaniasis in the Amazon region: natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania* (*Viannia*) *Lainsoni* in Pará State, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 86 (1), p. 127-130, 1991b.

SILVEIRA, F. T. Leishmaniose Cutanea Difusa (LCD) na Amazônia, Brasil: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Gaz. méd. Bahia**, 79 (Supl.3), p. 25-29, 2009.

SILVEIRA, F.T, et al. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará state, Brazil, caused by *Leishmania* (*Viannia*) *lindenbergi* n.sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon Region. **Parasite**, v.9, p. 43-50, 2002.

SILVEIRA, F.T. et al. Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae) no Estado do Pará, Brasil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, vol. 33(1), p. 18-22, 1991a.

SILVEIRA, F.T. et al. T cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from the Lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia*. **Parasite Immunology**, 20, p. 19–26, 1998.

SILVEIRA, F.T. et al. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. **Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, 85, 735-738, 1991c.

SILVEIRA, F.T. et al. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp.n., a new parasite from the state of Pará. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 82, p. 289-292, 1987.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 99(3), p. 239-251, 2004.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian J Med Res**, 123, p. 311-330, 2006.

SOUZA, A.A.A. et al. Fauna flebotomínica da Serra dos Carajás, Estado do Pará, Brasil, e sua possível implicação na transmissão da leishmaniose tegumentar americana. **Rev Pan-Amaz Saúde**, 1(1), p. 45-51, 2010.

SOUZA, B.S. **Leishmaniose Tegumentar Americana no Município de Ilheus-BA: Caracterização de casos humanos e fatores associados**. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em *Magister Scientiae*). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

SOUZA, C. S. F. et al. **As Leishmanioses**. Departamento de protozoologia. Fundação Oswaldo Cruz, 1997.

SOUZA, C.M et al. Study on Phlebotomine Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Fauna in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 99(8), p. 795-803, 2004.

TELES, C.B.G et al. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis and phlebotomine sandfly population, in the municipality of Monte Negro, State of Rondônia, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, 46(1), p. 60-66, 2013.

TELLERIA, J. et al. Trypanosoma cruzi: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. **Experimental Parasitology**, 114(4), p. 279-288, 2006.

TEODORO, U. et al. Reorganization and Cleanness of Peridomiciliar Area to Control Sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in South Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 47(2), p. 205-212, 2004.

TOJAL DA SILVA, A.C. et al. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, **Brazil. Trop Med Int Health**, 11, p. 1388-1398, 2006.

TOLEZANO, J.E. Ecoepidemiological Aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, vol. 89(3), p. 427-434, 1994.

VALE, E.C.S.; FURTADO, T. Leishmaniose Tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansao e etiologia. **An Bras Dermatol**. 80(4), p. 421-428, 2005.

VAN EYS, G.J et al. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. **Mol Biochem Parasitol**, 51(1), p. 133-142, 1992.

VAN DER MEIDE, W. et al., Comparison between Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, Real Time Reverse Transcriptase PCR, and Real-Time PCR for Quantification of *Leishmania* Parasites. **J. Clin. Microbiol.**, 46(1) p. 73–78, 2008.

VASQUEZ-TRUJILLO, A. et al. *Lutzomyia antunesi*, Probable Vector de Leishmaniasis Cutánea en el Área Rural de Villavicencio. **Rev. Salud Pública**. 10 (4), p. 625-632, 2008.

VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (Nota Preliminar). **Bras Med**. 25, p. 411, 1911.

VOLF, P. et al.. Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. **Int. J. Parasitol**. 34, p. 1221–1227, 2004.

VOLPINI, A.C et al., *Leishmania* identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. **Clinical Microbiology and Infection**, V. 12 Number 8, August, p. 793–821, 2006.

WEIGLE, K.A et al.. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. **J Clin Microbiol**, 40, p. 601–606, 2002.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. **Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)**. American Entomological Institute. Flórida (Eds.), 1994.

10. ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Humana do CEPEM/RO

REF.: Parecer 10/10 CEP/CEPEM
Registro no CEP: 112/2010


Porto Velho, 23 de Abril de 2010

Ilma. Dra. Izaltina Silva Jardim
Instituição: IPEPATRO

Sra. Pesquisadora, em sua terceira reunião realizada no dia 09 de Abril de Março de 2010, a Comissão de Ética do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM, atendendo sua solicitação, analisou o projeto sob sua responsabilidade intitulado: **“Identificação das espécies de Leishmania em flebotomíneos e indivíduos com Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de Rondônia”**. Informo que, após análise e discussão a Comissão de Ética considerou **APROVADO**, o citado projeto.

De acordo com o item VII.13.d, da Resolução CNS n.196/96, V.Sa. deve encaminhar a nossa secretaria relatórios anuais e final do referido projeto enquanto durar a pesquisa.

Atenciosamente,


Dra. Carla Freire Cetledonio Fernandes
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa



ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO: (TCLE)

Título do Projeto: Identificação das espécies de *Leishmania* em flebotômíneos e indivíduos com leishmaniose tegumentar americana nos municípios de maior incidência do estado de Rondônia

Pesquisadores e instituições envolvidas:

1. Dra. Izaltina Silva Jardim Cavalli - Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais de Rondônia, IPEPATRO
2. Dr. Eduardo Resende Honda - Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia – CEPEM/RO
3. Doutorado: Cesarino Junior Lima Aprigio – Aluno de Doutorado da UNIR e Funcionário do LACEN/RO

Objetivo principal:

- Identificar as espécies de *Leishmania* causadores de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em humanos, possibilitando o mapeamento da distribuição das espécies de *Leishmania* presentes nas infecções em humanos nos municípios de maior incidência de LTA no Estado de Rondônia.

Procedimentos relacionados ao participante:

a) Inclui a coleta das amostras por escarificação de lesões sugestivas de LTA para o exame parasitológico direto em lâminas, Intradermoreação de Montenegro (IDRM), caso a reação seja positiva em um dos testes citados, coleta por aspirado da borda da lesão para o cultivo de *Leishmania* e posteriormente a realização dos testes de Biologia Molecular (PCR) sob responsabilidade da Dra Izaltina Jardim (Orientadora) e Dr Eduardo Resende Honda (Co-Orientador). Não será realizado nenhum outro exame além do exposto nesta autorização.

b) As amostras serão identificadas com um número e não com nome. Somente os pesquisadores saberão a quem corresponde cada número. O material coletado ficará restrito ao Laboratório de Plataforma Técnica do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia – CEPEM/RO, Laboratório de Quimioterapia do Instituto de Pesquisa em Medicina Tropical – IPEPATRO, e ao Laboratório de Controle de Qualidade das Leishmanioses do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Rondônia – LACEN/RO

Possíveis riscos e desconfortos ao participante:

a) O desconforto observado será apenas na coleta devido a escarificação da lesão pode haver um pequeno sangramento local;

b) Dor da picada da agulha na injeção intradérmica do antígeno para a realização da IDRM do anestésico lidocaína a 2% sem vasoconstritor e aspiração do material (líquido intersticial) para o cultivo;

Benefícios

a) Pacientes participantes receberão resultado de laudo dos exames e quando positivo o resultado, encaminhados aos ambulatórios municipais responsáveis para o tratamento da LTA;

b) Não haverá remuneração aos pacientes participantes

Fui informado dos objetivos, procedimentos, riscos e benefícios desta pesquisa.

Pelo que os pesquisadores me explicaram e estou ciente, que além do preenchimento de uma ficha cadastral, será necessário fazer a escarificação da lesão que está presente na pele do meu corpo e quando apresentar lesão mucosa será realizado a IDRM. Caso o resultado seja positivo para LTA, será realizado aspirado da borda da lesão para realização do isolamento das *leishmanias* em cultivo para a identificação da espécie.

Foi explicado que as minhas informações serão guardadas em sigilo e que apenas os dados da pesquisa serão divulgados. Ninguém além dos pesquisadores terá acesso às minhas informações particulares.

Foi explicado também que tenho direito a receber informações adicionais sobre a pesquisa a qualquer momento, mantendo contato com o pesquisador principal.

Estou ciente de que a minha participação é voluntária e que se eu preferir não participar ou deixar de participar deste estudo em qualquer momento, isso NÃO me acarretará qualquer tipo de penalidade.

Compreendi tudo o que me foi explicado sobre a pesquisa e concordo em participar da mesma.

Assinatura do participante:.....
Assinatura do pesquisador principal:.....
TELEFONES: (69) 32198009
E-MAIL: izaltina@ipepatro.org

Digital

Data:dede 20.....

Eu, _____, entendi o que me foi explicado sobre o estudo e concordo em participar do mesmo.

Assinatura do paciente ou responsável, caso seja menor de idade; ou de duas testemunhas, caso não saiba assinar o nome)

(pesquisador)

Dra. Izaltina Jardim
Laboratório de Leishmanioses, Instituto de Pesquisa em Patologia Tropical -IPEPATRO
BR. 364, Km 3,5 –Porto Velho,RO CEP: 78900-000 , Telefone: (69) 225 9345

ANEXO 3 – Ficha Cadastral de Pacientes para Leishmaniose Tegumentar Americana

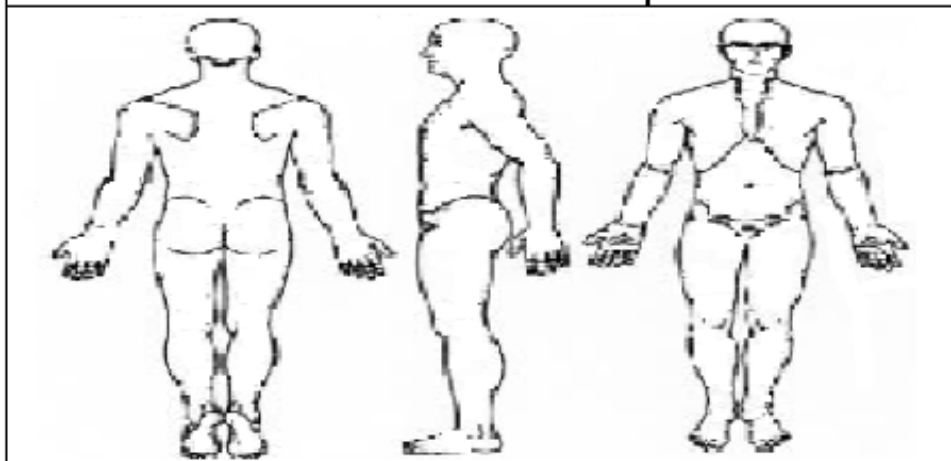
Ficha nº: _____

Ficha de pacientes para Leishmaniose Tegumentar Americana

Unidade da coleta:	nº de cadastro:
--------------------	-----------------

Identificação do Paciente

1 - Nome :		
2 - Idade:	3 - Sexo:	4 - Escolaridade:
5 - Atividade Ocupacional:		6 - Tempo nesta atividade:
7 - Endereço:		
8 - Bairro:		9 - Tempo de Residência em RO:
10 - Município de residência:		11 - Estado:
12 - Zona : <input type="checkbox"/> Urbana <input type="checkbox"/> Rural <input type="checkbox"/> Periurbana		13 - Fone:

**Dados complementares**

15 - Presença de Lesão: <input type="checkbox"/> Cutânea <input type="checkbox"/> Mucosa <input type="checkbox"/> Cutâneo-Mucosa	
Local(is): _____	
16 - Tipo de entrada <input type="checkbox"/> Caso novo <input type="checkbox"/> Recidiva	17 - Data provável de infecção ____/____/____
18 - Localidade provável de infecção: _____	
19 - Presença de cicatrizes cutâneas causadas por LTA <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Local(is): _____	
20 - Exames anteriores realizados para LTA <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	21 - Data do exame ____/____/____
22 - Quais? <input type="checkbox"/> Parasitológico direto <input type="checkbox"/> IDRM <input type="checkbox"/> Isolamento <input type="checkbox"/> Outros(especificar): _____	23 - Data provável do tratamento ____/____/____
24 - Realizou Tratamento <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	25 - Qual medicamento ? <input type="checkbox"/> Pentavalente <input type="checkbox"/> Anfotericina B <input type="checkbox"/> Pentamidina <input type="checkbox"/> Outros (especificar): _____
26 - Responsável pelo preenchimento: _____	
27 - Data do preenchimento: ____/____/____	

ANEXO 4 – Parecer da Comissão de Ética em Uso de Animais do IPEPATRO



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO DE PESQUISAS EM PATOLOGIAS TROPICAIS

Rua da Beira, 7671 BR364 Km 3,5, CEP 78912-000, Porto Velho, RO, Brazil
Telefone: (55) (69) 3219-6010 - Fax: (55) (69) 3219-6000

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo projeto 2008/2 registrado sob no 2008/2 na folha 2 do livro 1 da Comissão de ética no uso de Animais do IPEPATRO (CEUA IPEPATRO), sob a responsabilidade da Dra. Izaltina Silva Jardim coordenadora do projeto intitulado “identificação das espécies de Leishmania em flebotomíneos e indivíduos com leishmaniose tegumentar no estado de Rondônia”, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de Animais do IPEPATRO (CEUA IPEPATRO), em 11 de setembro de 2009.

Porto velho, 11 de setembro de 2009.

Relatores:

- Dra. Juliana Pavan Zuliani (Presidente CEUA IPEPATRO)

- Dra. Izaltina Silva Jardim

- Ms. Luiz Herman Soares Gil

Juliana Pavan Zuliani
Dra. Juliana P. Zuliani
Presidente CEUA IPEPATRO

Izaltina S. Jardim
Dra. Izaltina S. Jardim
CEUA IPEPATRO

Ms. Luiz Herman S. Gil
Ms. Luiz Herman S. Gil
CEUA IPEPATRO

ANEXO 5 – Artigo submetido

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene



The American Journal of
Tropical Medicine and Hygiene

Case Report: First Report of Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in Rondônia State, Brazil

Journal:	<i>American Journal of Tropical Medicine & Hygiene</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Clinical Case Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Aprigio, Cesarino; Fiocruz Rondonia, Laboratório de Quimioterapia Sánchez-Arcila, Juan; FIOCRUZ, Laboratório de Imunoparasitologia Honda, Eduardo; Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, Centro de Pesquisa em Medicina Tropical Oliveira, Márcia; FIOCRUZ, Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas Cupolillo, Elisa; FIOCRUZ, Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose Stábeli, Rodrigo; FIOCRUZ, FIOCRUZ Rondônia Oliveira-Ferreira, Joseli; FIOCRUZ, Laboratório de Imunoparasitologia Silva-Jardim, Izaltina; Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Biológicas
Key Words:	Leishmaniasis, Protozoan Infections

SCHOLARONE™
Manuscripts

RRH: DIFFUSE CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN RONDÔNIA, BRAZIL

LRH: APRIGIO AND OTHERS

**Case Report: First Report of Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in Rondônia State,
Brazil**

Cesarino J.L. Aprigio, Juan C. Sánchez-Arcila, Eduardo R. Honda, Márcia P. Oliveira

Elisa Cupolillo, Rodrigo G. Stabeli, Joseli de Oliveira-Ferreira, and Izaltina Silva-Jardim

Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil; Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, Porto Velho, Rondônia, Brazil; Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; Laboratório de Imunoquimioterapia, Fundação Oswaldo Cruz, Porto Velho, Rondônia, Brazil; Laboratório de Quimioterapia, Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais, Porto Velho, Rondônia, Brazil

*Corresponding Author: Izaltina Silva-Jardim¹, Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais-IPEPATRO, Laboratório de Quimioterapia, Rua da Beira, 7671 BR 364, Km 3,5; 76812-245, Porto Velho-RO, Brazil. Phone: +55 69 32196009; Fax: +55 69 32196000; E-mail: izaltina@ipepatro.org.br

¹**Present address:** Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Departamento de Ciências Biológicas (DCB), Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Jorge Amado, km 16, Salobrinho, Zip Code 45662-900, Ilhéus, BA, Brazil. Phone number: +55 73 36805315; Fax: +55 73 36805226; E-mail: isjcavalli@uesc.br

ABSTRACT

Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL) is an atypical clinical form of leishmaniasis characterized by non-ulcerating lesions with rich content of amastigotes, specific anergy to *Leishmania* antigens and a frequent failure to respond to leishmaniasis treatment. Here we report the first case of DCL caused by *L. amazonensis* in Rondônia state. The Leishmaniasis diagnosis was confirmed using parasitological and histopathological techniques. PCR-RFLP confirmed *L. (L) amazonensis* as etiologic agent of the infection. The cytokines profile in DCL patient was similar to healthy controls for most of the pro and anti-inflammatory cytokines except for IL-17A and IL-6. In contrast in LC patient most of the cytokines were increased. Although infections by *L. amazonensis* are not rare in the Amazon region and they have been reported in Rondônia, this is the first reported case of DCL in the state.

KEYWORDS

Diffuse Cutaneous Leishmaniasis, Rondônia, *Leishmania amazonensis*, Cytokines,

INTRODUCTION

Diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) is a clinical form of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) characterized by widely disseminated non-ulcerating skin papules, nodules, and plaques presenting high number of amastigotes inside the parasitophorous vesicles of the macrophages¹. Furthermore, DCL clinical form is characterized by a T-cell anergy to *Leishmania* antigens and a tendency to have relapses after treatment in infected individuals¹⁻³. DCL never heals spontaneously and is highly resistant to chemotherapy. In Brazil *L. amazonensis* has been associated to a wide spectrum of clinical disease, ranging from cutaneous to mucosal or visceral involvement⁴. Beyond that is the only species responsible for causing DCL clinical form⁵. Although *L. amazonensis* has been present in the

Amazon region, including Rondônia⁶, the occurrence of DCL has never been reported in this Brazilian state.

CASE REPORT

A 59 years-old man, born in a rural area of Guajará Mirim – Rondônia State, Brazil, had his first lesion in January-February 2009 and he had never traveled abroad. After obtained free and informed consent, the patient underwent clinical examination in April/2009 presenting a lesion located in the right portion of the scapular region with 15 cm of diameter and composed of developing coalescent small plaques. Punch biopsy of lesion showed an inflammatory process with innumerable plasmacytes and amastigotes forms. However the patient returns visit occurred only in November/2009. Only after a new direct parasitological diagnosis from lesion associated with Leishmanin skin test (LST) the treatment started. The direct parasitological exam showed amastigotes forms in many fields and inside macrophages and results of the LST was negative. Therefore, the patient received the first treatment for Leishmaniasis with N-Methyl Glucamine Antimoniate (Glucantime®) 15 mg/kg/d for 20 days. In March/2010, 4 months later, the patient returned to physical examination with small plaques (< 0.5 cm) in the nasal dorsum and in the distal and anterior portion of the right thigh. A second course of N-Methyl Glucamine Antimoniate (Glucantime®) 15 mg/kg/d was administered for a 30 days. This treatment failed and five months later, in September/2010 the patient had the same nodular and plaque cutaneous lesions in the distal and proximal region of the thigh and a new lesion in the right auricular lobule and canal (Figure 1). A Histopathological examination of the plaque scarification of the lesion located in the proximal region of the thigh revealed high numbers of *Leishmania* amastigotes (> 40 amastigotes/100 fields) and also a new negative LST result was obtained. At this time, interstitial aspirate of lesion was cultured in specific medium (NNN + Schneider + Fetal

1
2
3 Bovine Serum) and *Leishmania* parasites were isolated. Aspirates from the border of the
4
5 lesion were also cultured and inoculated in the right footpad of Balb/c mice. After 4 months
6
7 (February/2011) BALB/c mice developed a typical LTA lesion and parasites were isolated.
8
9 After two rounds of ineffective chemotherapy, the treatment was changed to 0.7 mg/kg/day
10
11 of Amphotericin B deoxicolate until cumulative dose of 1000 mg. Clinical improvement of
12
13 the lesions and remaining hyper pigmentation was observed in the lesion area. However, in
14
15 April/2011, 7 months after the end of Amphotericin B treatment, skin lesions reappeared in
16
17 both, thigh and auricular regions. A new LST was performed with negative results. The
18
19 microscopic examination of relapsed lesions revealed high numbers of amastigotes (> 40
20
21 amastigotes/100 microscope fields) and parasites were recovered from lesion. Interstitial
22
23 aspirate of the patients' lesion was inoculated in Balb/c mice and *Leishmania* parasites were
24
25 recovered after culture.
26
27

28
29 DNA was extracted from the parasites isolated from culture and a PCR targeting the
30
31 Internal Transcript Spacer (ITS) followed by the digestion of the product by RFLP⁷ was
32
33 done. The PCR-RFLP identified the parasite as *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. This
34
35 result was confirmed by multilocus enzyme electrophoresis of parasites isolated from the
36
37 same culture⁸. The patient was tested for *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium*
38
39 *leprae* (PPD 2011, BAAR 2009), mycosis and HIV, with negative results for all exams and in
40
41 September/2011 he was treated with 0.7 mg/kg/d of Amphotericin B deoxicolate until
42
43 cumulative dose of 1500 mg.
44
45

46
47 Four months later the patient had the same lesions and received 0.7 mg/kg/day of
48
49 Amphotericin B deoxicolate until cumulative dose of 1500 mg and the lesions resolved.
50
51 However in June/2012 the patient returned for clinical care due to reactivation of the lesions
52
53 in the thigh and a new round of clinical and laboratory exams including direct parasitological
54
55 exam and culture of the lesion aspirate was done. In August/2012 a treatment with
56
57
58
59
60

Liposomal Amphotericin B 150 mg/d until cumulative dose of 1500 mg was used and partial resolution of skin lesions was observed. Therefore in October/2012, the treatment with Liposomal Amphotericin B was maintained at 50mg/week dose by intravenous administration under hepatic and renal functions evaluation. In addition, circulating cytokine and chemokines levels were evaluated in the patient sera using Luminex technology in two time points: April/2011 after two rounds of treatment with glucantime and six months after the first round of treatment with Amphotericin B (Sample 2011) and August/2012, 16 months after the sample 2011, before treatment with liposomal Amphotericin B (Sample 2012). We also evaluated plasma samples from one patient with cutaneous leishmaniasis (genotyped as *L. braziliensis*) from the same area and from one healthy individual from non-endemic area. The assay was performed according to the manufacturer's instructions using a BioPlex-kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) with the Luminex system (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). A curve fit was applied to each standard curve according to the manufacturer's manual and sample concentrations were interpolated from the standard curves. The limit of quantification of cytokine detection using this method was 2pg/ml to all cytokines and chemokines.

The cytokines profile in DCL patient differed from CL patient. In DCL patient samples the levels of circulating IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-5, IL-13, IL-4, GM-CSF, G-CSF and IL-10 were similar to control (healthy individual) while in CL patients the levels of IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 were higher than control sample. The cytokines IL-1 β , IL-6, IL7 IL-12p70 and IL-17 were detected in both DCL and CL patients. However these cytokines levels were higher in CL patient when compared to DCL patients.

We detected increased levels of MIP1- β , MCP-1 and IL-8 chemokines in both DCL and CL clinical forms, being higher in DCL patients. Comparing the cytokine profile between DCL samples, we observed that the cytokines levels in 2011 were similar to 2012 sample

except for IL-12p70, IL-6, IL-17A, MIP-1 β , MCP-1 and IL-8 that were lower in 2012 (Figure 2).

DISCUSSION

Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL) is a rare form of American Cutaneous Leishmaniasis (LTA). This disease is characterized by chronic lesions with frequent relapses after treatment and specific anergy to Montenegro intradermal skin test^{1,9}. In leishmaniasis, some evidence indicate that a genetic background of the human host could have important influence in development and outcome of the disease^{10,11}. In America DCL is caused by the species *L. amazonensis*, *L. pifanoi*, and *L. mexicana* and is transmitted in Brazil by *Lutzomyia flaviscutellata*¹². Although cases of DCL caused by *L. amazonensis* have been reported in some Brazilian states as Maranhão, Pará, Bahia, Mato Grosso, Tocantins, Acre, Amapá Amazonas, Espírito Santo and Rio de Janeiro⁶, this is the first case of DCL in Rondônia state, in the northwestern of Brazil.

The patient presented a clinical outcome characteristic of DCL since the lesions appeared initially as coalescent small plaques in the scapular region and disseminated to right thigh and the right auricular lobe and canal even after treatments (Figure 1). Microscopical examination showed amastigotes forms in lesions and *Leishmania* (*L. amazonensis*) were identified by PCR-RFLP and by multilocus enzyme electrophoresis. In the period of 2009-2011 three Leishmanin skin tests were made, all of them with negative results. Additionally, the patient presented six relapses after treatment with two different drugs, Glucantime® and Amphotericin B. The specific anergy to *Leishmania* antigens and frequent relapses after treatment have been related to DCL clinical manifestation¹.

Despite few papers on cytokine production made in humans with DCL, our study is the first one to use a panel of 17 cytokines to quantify plasmatic cytokines and chemokines

1 simultaneously in a DCL patient. Sera obtained from a CL patient with one active lesion,
2
3 before the onset of chemotherapy were also studied in parallel. Our results showed that
4
5 plasmatic cytokine profile in DCL differed from CL patient. In DCL patient the levels of
6
7 most of the pro and anti-inflammatory cytokines were similar to healthy individual (control)
8
9 except for IL-17A and IL-6. In contrast in LC patient most of the cytokines were increased.
10
11 Low IFN- γ and IL-10 production have also been reported in patients with DCL determined
12
13 by ELISA on supernatants of stimulated cells ^{3,13}, by mRNA expression ^{3,14-16} and by
14
15 percentage of IFN- γ producing CD4⁺ cells ¹³. Interesting, chemokines levels were high in
16
17 both DCL and CL patients but MIP1- β and IL-8 were higher in DCL patients when
18
19 compared to CL patient. The increased levels of chemokines was also reported by Ritter et al.
20
21 1996¹⁵. In DCL patient the cytokines levels in sample 2012 decreased for all cytokines and
22
23 chemokines detected in sample 2011. As the DCL 2012 sample were collected after several
24
25 rounds of unsuccessful treatment therapeutic low cytokines and chemokines levels could be
26
27 related to effect of the treatment. Modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines
28
29 production by amphotericin B, antimony gluconate and pentamidine has been reported in
30
31 DCL patients and in healthy individuals. We know that cytokines do not act as isolated
32
33 molecules, and the relative amounts of other products that potentiate or neutralize their action
34
35 are of utmost importance in understanding the final result. Therefore a detailed study of the
36
37 influence of the treatment in the profile of cytokines and chemokines production is necessary
38
39 to understand the complex immunological network involved in DCL pathology. In
40
41 conclusion, our study reports the first case of a DCL in Rondônia State and that the patient
42
43 lesions was refractory the therapeutic approaches. Thus, it was demonstrated that *L.*
44
45 *amazonensis* is the responsible for the disease and the treatment remains a challenge.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Conflict of interest statement

The authors report no conflicts of interest in this work.

Acknowledgments

We thank for technical support the Centro de Pesquisa em Medicina Tropical – CEPEM, Laboratório Central em Saúde Pública de Rondônia – LACEN/RO, Fundação Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RO and the Laboratório de Pesquisa Médica em Leishmaniose Fundação Instituto Oswaldo Cruz /IOC/Rio de Janeiro. We also thank Dr. Andrea Barbieri de Barros from Hospital Especializado Centro de Medicina Tropical de Rondônia – CEMETRON for technical support.

Funding: FILACEN; SESAU/RO and IPEPATRO/RO for financial support.

Ethical approval:

This project was approved by Ethics Commission of Animal Care – CEUA IPEPATRO and the Commission of Ethics in Human Research from Centro de Pesquisa em Medicina Tropical – CEPEM, Porto Velho, Rondônia.

Competing interests: None declared.

Current Addresses

Cesarino J.L. Aprigio: *Laboratório de Quimioterapia Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil; Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil, cesarinovet@hotmail.com*

Juan C. Sánchez-Arcila: *Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, jucasaar@ioc.fiocruz.br*

Eduardo R. Honda: *Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, Porto Velho, Rondônia, Brazil, eduardohonda@hotmail.com*

Márcia P. Oliveira: *Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, marciapo@ioc.fiocruz.br*

Elisa Cupolillo: *Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ecupoli@ioc.fiocruz.br*

Rodrigo G. Stabeli: *Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Porto Velho, Rondônia, Brazil, rodrigostabeli@globo.com*

Joseli de Oliveira-Ferreira: *Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, lila@ioc.fiocruz.br*

Izaltina Silva-Jardim: *Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, Brazil, isjcavalli@uesc.br*

REFERENCES

1. Convit J, Pinardi ME, Rondón AJ. Diffuse cutaneous leishmaniasis: A disease due to an immunological defect of the host. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1972;66(4):603–610.

2. Azeredo-Coutinho RBG, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, Pacheco RS, Valette-Rosalino CM, Mendonça SCF. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2007;101(7):735–737.
3. Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of Cytokine Patterns Related to Therapeutic Response in Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. *Experimental Parasitology.* 1996;84(2):188–194.
4. Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Júnior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991;44(5):536–546.
5. Leon LL, Machado GMC, de Carvalho Paes LE, Grimaldi Jr G. Antigenic differences of *Leishmania amazonensis* isolates causing diffuse cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1990;84(5):678–680.
6. Basano S de A, Camargo LMA. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. *Revista Brasileira de Epidemiologia.* 2004;7(3):328–337.
7. Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 2004;90(1):31–37.
8. Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994;50(3):296–311.
9. Convit J, Kerdell-Vegas F. Disseminated Cutaneous Leishmaniasis; Inoculation to Laboratory Animals, Electron Microscopy and Fluorescent Antibodies Studies. *Arch Dermatol.* 1965;91:439–447.

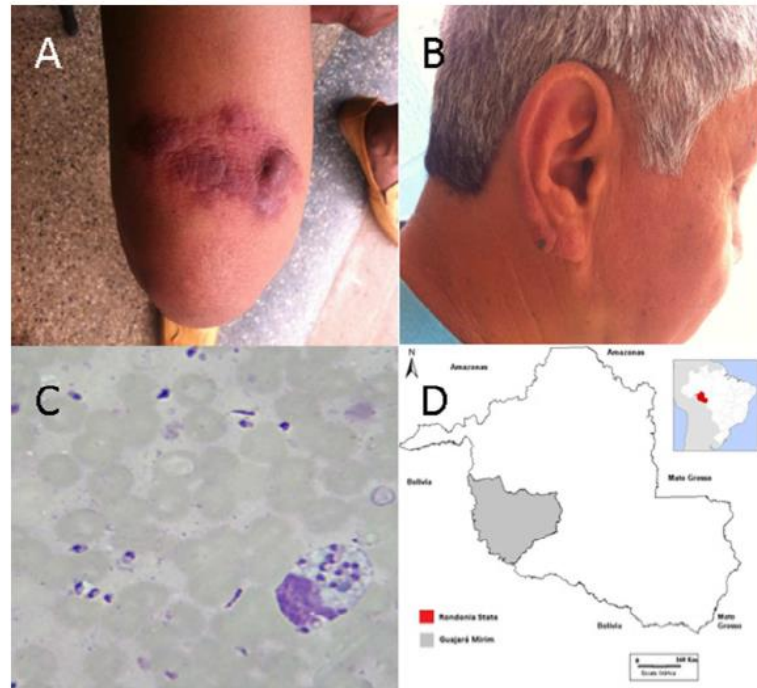
10. Lara ML, Layrisse Z, Scorza JV, Garcia E, Stoikow Z, Granados J, Bias W. Immunogenetics of human American cutaneous leishmaniasis. Study of HLA haplotypes in 24 families from Venezuela. *Hum. Immunol.* 1991;30(2):129–135.
11. Petzl-Erler ML, Belich MP, Queiroz-Telles F. Association of mucosal leishmaniasis with HLA. *Hum. Immunol.* 1991;32(4):254–260.
12. Lainson R, Shaw JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature.* 1978;273:595–600.
13. Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infect. Immun.* 2000;68(4):1760–1764.
14. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2004;99(3):239–251.
15. Ritter U, Moll H, Laskay T, Bröcker E, Velazco O, Becker I, Gillitzer R. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 1996;173(3):699–709.
16. Cáceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sánchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, Bloom BR, Convit J. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol.* 1993;91(3):500–505.

FIGURE LEGENDS

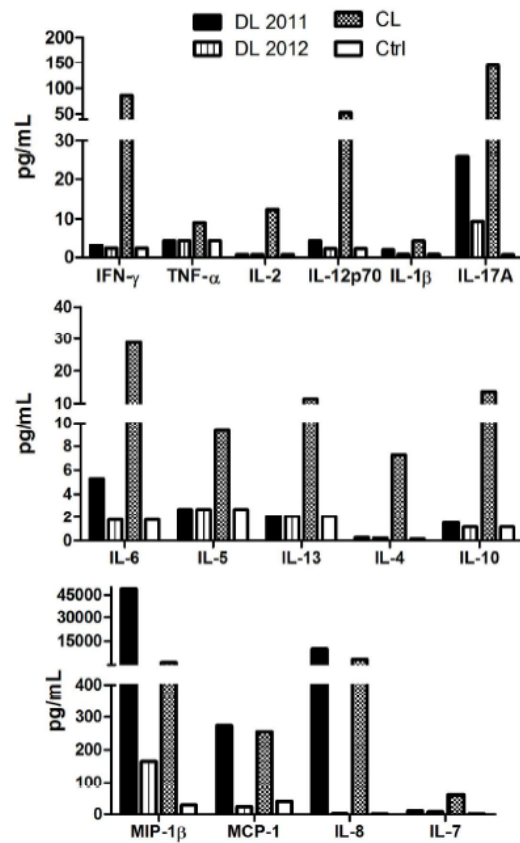
Figure 1. Localization of the thigh (A) and ear lobule (B) lesions. (C) Image of scarification parasitological exam. (D) Geographical localization of Porto Velho and Rondônia State.

Figure 2. Cytokine and chemokine profile in a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis.

DL: Diffuse cutaneous leishmaniasis, CL: Cutaneous leishmaniasis.



Localization of the thigh (A) and ear lobule (B) lesions. (C) Image of scarification parasitological exam. (D) Geographical localization of Porto Velho and Rondônia State. 201x183mm (72 x 72 DPI)



Cytokine and chemokine profile in a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. DL: Diffuse cutaneous leishmaniasis, CL: Cutaneous leishmaniasis.
129x187mm (300 x 300 DPI)